

I. **PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : **2004-000128**

(43)Date of publication of application : **08.01.2004**

(51)Int.Cl. C12Q 1/68
 C12N 15/09
 C12Q 1/02
 C12Q 1/42
 C12Q 1/44
 G01N 27/447
 G01N 33/53
 G01N 33/566

(21)Application number : **2002-331107** (71)Applicant : **JAPAN SCIENCE &
TECHNOLOGY CORP**
(22)Date of filing : **14.11.2002** (72)Inventor : **OKA TAKASHI
OUCHIDA MAMORU**

(30)Priority
Priority number : **2002103495** Priority date : **05.04.2002** Priority country : **JP**

(54) HEMATOPOIETIC ORGAN TUMOR CELL DETECTION METHOD AND HEMATOPOIETIC ORGAN TUMOR CELL DETECTION KIT

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a hematopoietic organ tumor cell detection method which detects with high sensitivity and high specificity a hematopoietic organ tumor cell, and a detection kit.

SOLUTION: The hematopoietic organ tumor cell detection method comprises the steps of: quantifying a tyrosine phosphatase SHP1 protein specific to a hematopoietic organ cell included in a specimen sample containing the hematopoietic organ cell; and identifying methylation of CpG islands included in the base sequencing of the SHP1 gene obtained from the above-mentioned specimen sample. Thus, since the presence or absence of the hematopoietic organ tumor cell is identified at two stages by one genetic information, the hematopoietic organ tumor cell is detectable by a very high specificity.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1]

(1) A SHP1 gene-methylation check process which checks methylation of a CpG island included in a base sequence of protein tyrosine phosphatase SHP1 gene specific into a hematopoietic organ cell included in a sample sample containing a hematopoietic organ cell,

(2) a SHP1 gene-product fixed-quantity process of quantifying at least one expression amount of SHP1 protein obtained from the above-mentioned sample sample, and SHP1mRNA -- and

(3) A SHP1 gene LOH check process which checks existence of heterozygosity loss (LOH) of SHP1 gene contained in the above-mentioned sample sample,

** -- a hematopoietic organ tumor cell detection method by which it being included any they are even if small.

[Claim 2]

In the above-mentioned SHP1 gene-methylation check process

A gene cutting trial stage processed with a methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes a base sequence which includes a genetic material obtained from the above-mentioned sample sample for cytosine,

A gene amplification trial stage of enforcing a polymerase chain reaction method (PCR) using a primer which amplifies a field which is included in a base sequence of the SHP1 above-mentioned gene, and includes a base sequence by which recognition cutting is carried out in the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme to a gene processed with the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme,

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 1, wherein the amount check stage of gene amplification of checking quantity of a gene of amplified specific size is included.

[Claim 3]

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 2, wherein the above-mentioned primer is a partial base sequence further included in a base sequence shown in the array number 1 or 2, or the polynucleotide which has this partial base sequence and complementarity.

[Claim 4]

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 2 or 3 characterized by checking quantity of a gene of specific size using an electrophoresis method in the above-mentioned amount check stage of gene amplification.

[Claim 5]

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 2, 3, or 4 characterized by using a methylation sensitivity restriction enzyme as a restriction enzyme in the above-mentioned gene cutting trial stage.

[Claim 6]

In the above-mentioned SHP1 gene-methylation check process

A gene ornamentation stage of processing a genetic material obtained from the above-mentioned sample sample by a bisulfite,

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 1, wherein a methylation cytosine content judging stage included in a genetic material processed by a bisulfite

of judging existence of methylation cytosine in a base sequence of SHP1 gene is included.

[Claim 7]

A way PCR detects methylation cytosine in the above-mentioned methylation cytosine content judging stage, The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 6, wherein it is used at least among a way determination of a base sequence of a gene detects methylation cytosine, or a method of identifying a base sequence containing methylation cytosine any they are.

[Claim 8]

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 6 or 7 characterized by using sodium bisulfite as a bisulfite in the above-mentioned gene ornamentation stage.

[Claim 9]

A hematopoietic organ tumor cell detection method given in any 1 paragraph of claims 1 thru/or 8 quantifying SHP1 protein in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process using SHP1 antibody which uses SHP1 protein as an antigen.

[Claim 10]

The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 9 characterized by quantifying SHP1 protein by enzyme-labeled antibody technique or a western blotting method in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process.

[Claim 11]

By detecting a manifestation of mRNA of SHP1 gene using polynucleotide which detects an overall length of a base sequence, or its part of SHP1 gene cDNA shown in the array number 3 in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process, A hematopoietic organ tumor cell detection method given in any 1 paragraph of claims 1 thru/or 8 quantifying SHP1 mRNA.

[Claim 12]

In the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process, a northern blotting method, The reverse transcription PCR method, the real-time PCR method, or RNA in The hematopoietic organ tumor cell detection method according to claim 11, wherein a manifestation of mRNA of SHP1 gene is detected by a situ hybridization method.

[Claim 13]

Two Microsatellite markers which put the SHP1 above-mentioned gene at least a check of existence of heterozygosity loss on the other hand, Or a hematopoietic organ tumor cell detection method given in any 1 paragraph of claims 1 thru/or 12 carrying out gene polymorphism like simple nucleotide polymorphism which exists the inside of the above-mentioned SHP gene, and near it in the fragmentation analysis using PCR.

[Claim 14]

It is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell,

(1) SHP1 antibody which uses protein tyrosine phosphatase SHP1 protein specific into a hematopoietic organ cell as an antigen -- and

(2) A methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes a base sequence containing cytosine,

A hematopoietic organ tumor cell detection kit comprising:

A primer for PCR which amplifies a field which is included in a base sequence of SHP1 gene and includes a base sequence recognized by the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme.

the methylation positivity of the SHP1 above-mentioned gene, and inside with methylation

negative control DNA -- at least -- on the other hand.

[Claim 15]

It is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell,

(1) SHP1 antibody which uses protein tyrosine phosphatase SHP1 protein specific into a hematopoietic organ cell as an antigen,

(2) a primer for a judgment of existence of cytosine in a base sequence of SHP1 gene contained in a genetic material processed by bisulfite refined to a gene processing level, and this bisulfite -- and

(3) A hematopoietic organ tumor cell detection kit containing any at least one of primers for PCR which detect an overall length of a base sequence, or its part of SHP1 gene cDNA shown in the array number 3.

[Claim 16]

It is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell,

A hematopoietic organ tumor cell detection kit containing a primer for PCR which detects at least one overall length of two Microsatellite markers which put protein tyrosine phosphatase SHP1 specific gene between a hematopoietic organ cell, or its part.

[Claim 17]

The hematopoietic organ tumor cell detection kit according to claim 14, 15, or 16 containing either [at least] a reagent for PCR, or a reagent for a restriction enzyme reaction.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]

This invention relates to the hematopoietic organ tumor cell detection kit used suitably for a hematopoietic organ tumor cell detection method and this detecting method.

By detecting methylation of SHP1 gene which encodes manifestation reduction, disappearance, or this of protein tyrosine phosphatase SHP1 specific gene product to a malignant lymphoma, leukemia, etc. especially, for example, It is related with the detecting method and detection kit which can detect hematopoietic organ tumor cells on high sensitivity and a high unique target.

[0002]

[Description of the Prior Art]

Various kinds from what has a very bad prognosis to what has a comparatively good prognosis are known for intractableness by hematopoietic organ tumors (tumor of blood systems) in Homo sapiens (Homo sapiens), such as a malignant lymphoma and leukemia. Although various therapies, such as various chemotherapies, radiotherapy, or immunotherapy, are already put in practical use by the therapy of this hematopoietic organ tumor, even if tumor cells carry out regression mostly as a result of such a therapy, if tumor cells survive slightly, the relapse of a hematopoietic organ tumor will not be escaped.

[0003]

Diagnosis of the above-mentioned hematopoietic organ tumor is synthetically carried out by using two or more modalities together by the former. Using peripheral blood and various biopsy specimens, the morphological observation and the histological observation by a tissue staining color, immunity dyeing, etc. are carried out, or, specifically, further various molecular biological analyses, chromosome analyses, etc. are carried out. Diagnosis of the above-mentioned hematopoietic organ tumor takes time most by judgment.

[0004]

TECHNICAL PROBLEM

[Problem(s) to be Solved by the Invention]

each above-mentioned conventional modality -- it -- if independent -- hematopoietic organ tumor cells -- high sensitivity -- high -- it is not specifically and promptly detectable. So, in the modality of these former, if plurality is used together and it does not judge synthetically, a hematopoietic organ tumor cannot be diagnosed.

[0005]

That is, as long as the conventional modality is used, in order to have to use two or more modalities together, it not only causes complicated-ization of diagnosis, but time is taken, and since neither hematopoietic organ tumor cell detection sensitivity nor singularity is high, a medical practitioner's special judgment will occupy big specific gravity to diagnosis. Therefore, in the former, the diagnostic technique of a hematopoietic organ tumor is not used for the purpose of the early detection and early treatment of the hematopoietic organ tumor by a mass screening, although it is substantially restricted to use in a medical site and can respond to each disease person.

[0006]

In order to carry out hematopoietic organ tumor cells on high sensitivity and a high unique target more, it is possible to use the marker with high sensitivity specifically looked at by the hematopoietic organ tumor of the wide range to hematopoietic organ tumor cells. If such a marker is used, early detection and diagnosis of a hematopoietic organ tumor can be carried out easily and promptly, It not only becomes possible to apply to the early treatment and recurrence prevention of a malignant lymphoma, leukemia, etc., but on medical science, it can consider it as available diagnostic technique at clinical laboratory test industry, pharmaceutical industry, etc., and it becomes possible to contribute to development of industry. However, such a marker is not known the place by the present.

[0007]

This invention is made in view of an aforementioned problem, and the purpose, Using molecular biological knowledge, hematopoietic organ tumor cells are detected from a small amount of patient samples on high sensitivity and a high unique target promptly and simple, the early detection, diagnosis, and early treatment of a hematopoietic organ tumor are made easy, and it is in providing a hematopoietic organ tumor cell detection method and a detection kit applicable also to a mass screening.

[0008]

MEANS

[Means for Solving the Problem]

As a result of inquiring wholeheartedly in view of an aforementioned problem, this invention persons in a large malignant hematopoietic organ tumor of a range. In a hematopoietic organ tumor with malignancy high moreover in which expression inhibition of protein tyrosine phosphatase SHP1 protein is extremely seen by high frequency, By using as a marker both sides of SHP1 gene which finds out that a tendency of expression inhibition of the SHP1 above-mentioned protein becomes strong, and encodes SHP1 gene product and this. high sensitivity of hematopoietic organ tumor cells -- high -- a thing [specific and] for which hematopoietic organ tumor cell detection art which can be detected in a short time and can be used industrially can be realized is found out, and it came to complete this invention.

[0009]

Namely, a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, . In order to solve the above-mentioned technical problem, are contained in a sample sample containing (1) hematopoietic organ cell. A SHP1 gene-product fixed-quantity process of quantifying at least one expression amount of protein tyrosine phosphatase SHP1 specific protein and SHP1mRNA into a hematopoietic organ cell, (2) A SHP1 gene-methylation check process which checks methylation of a CpG island included in a base sequence of SHP1 gene acquired from the above-mentioned sample sample, And it is characterized by including at least one side of SHP1 gene LOH check process ** which checks existence of heterozygosity loss (LOH) of SHP1 gene contained in the (3) above-mentioned sample sample.

[0010]

This phenomenon is not looked at by normal blood cell to expression inhibition of the SHP1 above-mentioned gene product being extremely looked at by malignant hematopoietic organ tumor cells by high frequency. Expression inhibition of the SHP1 above-mentioned protein is based on methylation of SHP1 gene. One allele of SHP1 gene has lost before and after transfer control of SHP1 gene by DNA methylation.

[0011]

By according to the described method, checking methylation of SHP1 gene obtained from a sample sample using the above-mentioned knowledge, and detecting existence of hematopoietic organ tumor cells. screening existence of existence of malignant hematopoietic organ tumor cells -- on the other hand -- SHP in a sample sample -- a manifestation of SHP1 protein, SHP1mRNA, or its both is specifically quantified 1 gene product.

[0012]

That is, in a described method, inactivation of SHP1 gene can be judged using four-fold marker by the maximum called loss of ornamentation and mRNA of gene DNA, protein, and allele. namely, one hematopoietic organ tumor cell called a SHP1 gene-expression fall -- since a specific phenomenon can be checked in four steps, hematopoietic organ tumor cells are detectable by very high singularity.

[0013]

As a desirable example of a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, A gene cutting trial stage processed with a methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes a base sequence which includes in the above-mentioned SHP1 gene-methylation check process a genetic material obtained from the above-mentioned sample sample for cytosine, It is contained in a base sequence of the SHP1 above-mentioned gene to a gene processed with the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme, A detecting method with which a gene amplification trial stage of enforcing the PCR method using a primer

which amplifies a field including a base sequence by which recognition cutting is carried out, and the amount check stage of gene amplification of checking quantity of a gene of amplified specific size are included in the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme can be mentioned.

[0014]

According to the described method, after distinguishing existence of methylation by trying cutting of SHP1 gene contained in a genetic material obtained from a sample sample using a methylation sensitivity restriction enzyme and amplifying using PCR further, quantity of an PCR product of specific size obtained is checked. So, if even a little SHP1 genes are obtained from a sample sample, methylation of SHP1 gene is detectable. Therefore, even if hematopoietic organ tumor cells exist very much in a sample sample only in a minute amount, it is high detection sensitivity, and it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target moreover.

[0015]

In the above-mentioned detecting method, it is preferred that the above-mentioned primer is a partial base sequence further included in a base sequence shown in the array number 1 or 2 or the polynucleotide which has this partial base sequence and complementarity.

[0016]

In the above-mentioned detecting method, it is preferred to check quantity of a gene of specific size in the above-mentioned amount check stage of gene amplification using an electrophoresis method.

[0017]

In the above-mentioned detecting method, it is preferred to use a restriction enzyme in which a methylation insensitive restriction enzyme which recognizes the same base sequence is known as a methylation sensitivity restriction enzyme in the above-mentioned gene cutting trial stage.

[0018]

As other examples with a preferred hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, A gene ornamentation stage of processing a genetic material obtained from the above-mentioned sample sample by a bisulfite to the above-mentioned SHP1 gene-methylation check process, A detecting method with which a methylation cytosine content judging stage included in a genetic material processed by a bisulfite of judging existence of methylation cytosine in a base sequence of SHP1 gene is included can be mentioned.

[0019]

If a genetic material obtained from a sample sample using a bisulfite is processed according to the described method, cytosine in a base sequence will be changed into uracil, but methylated cytosine is not changed. Therefore, methylation of SHP1 gene is detectable only by judging whether cytosine is contained in a base sequence of SHP1 gene after a gene ornamentation stage. Therefore, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by a simple mechanism.

[0020]

In the above-mentioned detecting method, in the above-mentioned methylation cytosine content judging stage. It is desirable even if it is used at least among processings of a gene by way PCR detects methylation cytosine, way determination of a base sequence of a gene detects methylation cytosine, or a method of identifying a base sequence containing methylation cytosine any they are.

[0021]

By using PCR at least according to the described method, if even a little SHP1 genes are obtained from a sample sample, methylation of SHP1 gene is detectable. Therefore, even if hematopoietic organ tumor cells exist very much in a sample sample only in a minute amount, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by high detection sensitivity.

[0022]

In the above-mentioned detecting method, it is preferred that sodium bisulfite is used as a bisulfite in the above-mentioned gene ornamentation stage. In the above-mentioned gene ornamentation stage, urea may be used together with a bisulfite.

[0023]

In a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, even if it is a detecting method of which example of the above, when SHP1 protein is quantified in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process using SHP1 antibody which uses SHP1 protein as an antigen, it is desirable. Specifically in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process. It is desirable when SHP1 protein is quantified by enzyme-labeled antibody technique (an immunohistochemical method, an immunocytochemistry method, the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method) or a western blotting method.

[0024]

Since SHP1 protein will be quantified using an antigen-antibody reaction according to the described method, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by a simple mechanism.

[0025]

Or in a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, Even if it is a detecting method of which example of the above, in the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process. By detecting a manifestation of mRNA of SHP1 gene using polynucleotide which detects an overall length of a base sequence, or its part of SHP1 gene cDNA shown in the array number 3, even if it quantifies SHP1 mRNA, it is desirable. Specifically at the above-mentioned SHP1 gene-product fixed-quantity process, they are a northern blotting method, the reverse transcription PCR method, the real-time reverse transcription PCR method, or RNA in. It is desirable when a manifestation of mRNA of SHP1 gene is detected by a situ hybridization method.

[0026]

Since SHP1 gene product will be quantified by mRNA of SHP1 gene as SHP1 gene product according to the described method, a mechanism simple by using oligopeptide which has cDNA and homology of SHP1 gene as a probe or a primer -- high -- it becomes possible specific and to detect hematopoietic organ tumor cells to high sensitivity.

[0027]

a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention -- it is desirable -- as other examples to a pan, Two Microsatellite markers which put the SHP1 above-mentioned gene at least a check of existence of heterozygosity loss on the other hand, Or a method enforced by [which used PCR] conducting fragmentation analysis in gene polymorphism like simple nucleotide polymorphism which exists the inside of the above-mentioned SHP1 gene and near it can be mentioned. The sample sample used at this time should just be a sample sample containing a hematopoietic organ cell. As contrast, a sample obtained after complete hematological remission may be used, and other normal tissue cells may be used.

[0028]

Since heterozygosity loss of SHP1 gene is checked by checking heterozygosity loss of gene polymorphism, such as a Microsatellite marker or simple nucleotide polymorphism (SNP), by PCR according to an above-mentioned method, It becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells more certainly by a simple mechanism.

[0029]

As a desirable example of a hematopoietic organ tumor cell detection kit concerning this invention, It is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell, (1) A methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes a base sequence which contains in a hematopoietic organ cell SHP1 antibody which uses protein tyrosine phosphatase SHP1 specific protein as an antigen, and (2) cytosine, Composition containing at least one side can be mentioned among a primer for PCR which amplifies a field which is included in a base sequence of SHP1 gene and includes a base sequence by which recognition cutting is carried out in the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme, and the methylation positivity of the SHP1 above-mentioned gene and methylation negative control DNA.

[0030]

Or as other examples with a preferred hematopoietic organ tumor cell detection kit concerning this invention, A bisulfite which was used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell, and was refined to (1) above-mentioned SHP1 antibody and (2) gene processing level, A primer for a judgment of existence of cytosine in a base sequence of SHP1 gene contained in a genetic material processed by this bisulfite, And composition containing any at least one of primers with an overall length, or its part and homology of a base sequence of the SHP1 gene cDNA shown in the (3) array number 3 for PCR can be mentioned.

[0031]

As other examples in which a hematopoietic organ tumor cell detection kit concerning this invention is preferred, It is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from a sample sample containing a hematopoietic organ cell, Composition containing a primer for PCR which detects at least one overall length of two Microsatellite markers which put protein tyrosine phosphatase SHP1 specific gene between a hematopoietic organ cell, or its part can be mentioned.

[0032]

In the above-mentioned hematopoietic organ tumor cell detection kit, it is still more preferred that either [at least] a reagent for PCR or a reagent for a restriction enzyme reaction is included.

[0033]

Even if it is which composition of the above, in order to enforce a hematopoietic organ tumor cell detection method mentioned above, desirable drugs, a specimen, etc. are contained. Therefore, a hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention can be enforced easily and promptly by using the above-mentioned detection kit, and it becomes possible to use this invention on industrial levels, such as clinical laboratory test industry and pharmaceutical industry.

[0034]

[Embodiment of the Invention]

[Embodiment 1]

It will be as follows if one gestalt of the operation in this invention is explained based on drawing 1 thru/or drawing 24. This invention is not limited to this.

[0035]

While this invention quantifies protein tyrosine phosphatase SHP1 gene product, i.e., SHP1 protein, and mRNA from a promotor specific into a hematopoietic organ cell which are contained in the sample sample containing a hematopoietic organ cell, It is the art of detecting hematopoietic organ tumor cells out of the above-mentioned sample sample by checking the methylation of the CpG island included in the base sequence of SHP1 gene acquired from the above-mentioned sample sample.

[0036]

SHP1 gene used as a marker for detecting hematopoietic organ tumor cells by this invention, Exist in the chromosome 12p13 and the base sequence shown in drawing 1 - drawing 10, and the array number 1 is made into the sense strand of genomic DNA (wild type), It is a gene which has an exon (a figure and an array table Chuo University field shown in written form) of 16 which makes an antisense strand the base sequence shown in drawing 11 - drawing 20, and the array number 2. The cDNA has the size of about 1.8 kbs which have a base sequence shown in drawing 21 and the array number 3. SHP1 gene is the same gene as SH-PTP1, PTP1C, HCP, HCPH, PTPN6, HPTP1C, and SHP-1L.

[0037]

SHP1 protein by which the code is carried out to the SHP1 above-mentioned gene, As it is protein tyrosine phosphatase (PTPase) specific into various hematopoietic organ cells and is shown in drawing 22 by molecular weight 68kD, It has the structure of having two SH2 (Src homology domain 2) fields (270 amino acid residue) which serve as tandem construction at the amino terminal side, a PTPase domain of 246 amino acid residue, and the C terminal side field of 93 amino acid residue. It has an amino acid sequence shown in drawing 23 and the array number 4.

[0038]

In a human hematopoietic organ tumor, for example, a malignant lymphoma, and leukemia. The strong expression inhibition of SHP1 protein is seen by not less than 90% of high frequency by many kinds (for example, refer to American Journal of Pathology, Vol.159, No.4, and October2001:1495-1505 grade). Thus, in malignant hematopoietic organ tumor cells, this phenomenon is not looked at by the normal blood cell to the expression inhibition of the SHP1 above-mentioned protein being extremely seen by high frequency.

[0039]

This invention persons found out uniquely that the expression inhibition of the SHP1 above-mentioned protein made a cause the transfer abnormality by the SHP1 above-mentioned gene being methylated.

[0040]

For example, as shown in drawing 24, in the sense strand (it illustrates up to 181 bases - 2160 bases) of the genomic DNA (wild type) shown in drawing 1 - drawing 10, and the array number 1, promoterregion exists before the exon (figure Chuo University character) of 1001 bases - 1163 bases, but. CG arrangement with which cytosine (C) and guanine (G) are located in a line exists in this neighborhood mostly, and forms the CpG island (CpG island) in it (in drawing 24, shading of a bold letter shows CG arrangement). Although cytosine of this CpG island is not methylated in a normal hematopoietic organ cell, many of cytosine of the above-mentioned CG arrangement is methylated, for example by the malignant cell lymphoma. Of course, methylation of cytosine in this CG arrangement is produced not only like a sense strand but like an antisense strand.

[0041]

Advanced methylation of CpG arrangement in the above-mentioned CpG island prevents transfer of mRNA from DNA of SHP1 gene, and, as a result, production of SHP1 protein is controlled. It is extremely concluded by high frequency by hematopoietic organ tumor cells that this phenomenon was mentioned above. And methylation of DNA in SHP1 gene disappears thoroughly, and very high correlation is seen between the knowledge on molecular biology, and the knowledge on clinical at various hematopoietic organ tumor patients' complete remission term. So, it is guessed that the SHP1 gene-expression control by methylation has played the important role in the onset mechanism of hematopoietic organ tumor cells. So, in this invention, the phenomenon of the above-mentioned SHP1 gene-expression control is used as a marker of hematopoietic organ tumor cells.

[0042]

It also found this invention persons uniquely that one allele of SHP1 gene loses before and after transfer control of SHP1 gene arises according to the DNA methylation mentioned above, when the symptoms of diseases, such as a malignant lymphoma and leukemia, develop. Then, it becomes possible by checking heterozygosity loss of SHP1 gene to check loss of the allele of SHP1 gene. So, heterozygosity loss of SHP1 gene can also be used as a marker of hematopoietic organ tumor cells.

[0043]

In a malignant lymphoma or leukemia, a fall or disappearance of DNA methylation of high frequency, heterozygosity loss of high frequency, and SHP1 gene expression is detected by SHP1 gene, and it is in the tendency for outpatient department SHP1 transgenics to control growth of the cell of a corpuscle system, further at it. Thereby, it is suggested strongly that SHP1 gene is one of the antioncogenes.

[0044]

Then, methylation of the CpG island included according to a SHP1 gene-methylation check process in this invention in the base sequence of SHP1 gene obtained from the above-mentioned sample sample is checked, Either [at least] SHP1 protein contained in the sample sample which contains a hematopoietic organ cell at a SHP1 gene-product fixed-quantity process, or mRNA is quantified, and three processes of checking heterozygosity loss of SHP1 gene are further used by a SHP1 gene LOH check process. These processes may be used independently and both sides may be used. In a SHP1 gene-product fixed-quantity process, only SHP1 protein may be quantified, only SHP1 mRNA may be detected and both sides may be detected.

[0045]

By this, it screens by detecting methylation of SHP1 gene in a sample sample first, for example, Then, the detection process of becoming final and conclusive existence of hematopoietic organ tumor cells can be carried out by checking the existence of malignant hematopoietic organ tumor cells by quantifying the manifestation of SHP1 gene product of a sample sample at least by one side of SHP1mRNA and SHP1 protein.

[0046]

Therefore, in this invention, SHP1 gene expression can be judged using four-fold marker by the maximum called loss of ornamentation and mRNA of gene DNA, protein, and allele. namely, one hematopoietic organ tumor cell called a SHP1 gene-expression fall -- since a specific phenomenon can be checked by a three-stage, hematopoietic organ tumor cells are detectable by very high singularity.

[0047]

As mentioned above, it is also checked that it is in the tendency which controls growth of the cell of a corpuscle system by introducing SHP1 gene in this invention. So, SHP1 gene is possible also for using for gene therapy, for example, can expect to control growth of tumor cells by transfecting tumor cells in a SHP1 gene-expression vector.

[0048]

The sample sample used by this invention is not especially limited no matter it may be what sample sample, if it is a sample sample containing hematopoietic organ cells, such as peripheral blood or bone marrow fluid. With the hematopoietic organ cell in this invention, although various blood cells are included, various leucocytes are mentioned especially preferably. More specifically, a lymphocyte (a T cell and a B cell), granulocyte (neutrophil leucocyte, eosinophile leucocyte, basophilic leucocyte), monocyte and a macrophage, a mast cell, a spontaneous killer cell, etc. can be mentioned. Or they may be a hematopoietic stem cell and lymphoid precursors.

[0049]

Therefore, in the sample sample used by this invention. It is good also as a sample sample for analysis which is easy to carry out molecular biology analysis by performing publicly known processing conventionally to the blood and the body fluid which extracted blood, bone marrow fluid or body fluid etc. in which the above-mentioned hematopoietic organ cell is contained from Homo sapiens, could use this as a sample sample as it was, and were extracted.

[0050]

As a hematopoietic organ tumor which can apply this invention, specifically, for example, chronic myelogenous leukemia and a Philadelphia chromosome positive (+ (9; 22) (qq34;q11).) Various myeloproliferative disorder, such as BCR/ABL chronic myelogenous leukemia, chronic neutrophil leucocyte leukemia, chronic eosinophile leucocyte leukemia / hypereosinophilic syndrome, chronic outbreak nature bone marrow fibrosis, polycythemia vera, essential thrombocytosis, and other myeloproliferative disorder that cannot be classified; Bone marrow atypicality / myeloproliferative disorder, such as chronic myelogenous monocytic leukemia, atypical chronic-myelogenous-leukemia, and infancy nature myelogenous monocytic leukemia;

Bone marrow atypical syndromes, such as refractory anemia (bone marrow atypical syndrome) accompanied by the intractable hypocytosis (bone marrow atypical syndrome) and superfluous blast cell 5q-syndrome accompanied by the refractory anemia accompanied by ringed sideroblast, refractory anemia without ringed sideroblast, and a multi-series metaplasia, and other bone marrow atypical syndromes which cannot be classified;

The acute myelogenous leukemia (AML) accompanied by a recurrent cytogenetic translocation. for example, AML and AML1(CBF-alpha)/accompanied by + (8; 21) (q22;q22), [ETO and] the myelogenous leukemia before acuteness (AML accompanied by + (15; 17) (q22;q11-12) -- and - the --) [and] PML/RAR-alpha and unusual marrow eosinophil (inv (16), (p13q22), or + (16; 16) (p13;q11).) AML accompanied by CBF beta/MYH 11X, AML accompanied by 11q23 (MLL) abnormalities, AML accompanied by a multi-series metaplasia with front bone marrow atypical syndrome, AML without a multi-series metaplasia with front bone marrow atypical syndrome, AML related to a therapy, and bone marrow atypical syndrome (related to an alkylating agent --) [and] The therapy related to epipodophyllotoxin, or the therapy of other types, AML (a low differentiation type, a thing without maturation, and the thing accompanied by maturation.) which otherwise does not belong to a section acute myelogenous monocytic leukemia, acute monocytic leukemia, acute erythroblast leukemia, acute megakaryocyte leukemia, the acute basophilocytic leukemia, the acute over***** vegetation accompanied by

the bone marrow fibrosis, and acute 2 character -- acute-myelogenous-leukemia [, such as sex leukemia] (AML);

a precursor B cell nature tumor (the precursor B-lymphoblastic leukemia / lymphoma (precursor B cell acute lymphoblastic leukemia).) a mature (tip) B cell nature tumor (B cell chronic lymphocytic leukemia / small lymphocytic lymphoma.) B cell prolymphocytic leukemia, a lymphoplasmacytic lymphoma, spleen verge field B cell lymphoma (+/-villus lymphocyte), Pilliform cell leukemia, plasma cell myeloma (plasmocytoma), the verge type B cell lymphoma outside a MALT type paragraph, **** verge type B cell lymphoma (+/- monocyte type B cell), a follicular lymphoma, a mantle cell lymphoma, diffusion large-sized B cell lymphoma (mediastinum large cell B cell lymphoma, primary exudation lymphoma), and Burkitt B cell nature tumors, such as a lymphoma / Burkitt cell leukemia;

a precursor T cell nature tumor (the precursor T-lymphoblastic leukemia / lymphoma (precursor T cell acute lymphoblastic leukemia).) a mature (tip) T cell nature tumor (T cell prolymphocytic leukemia and T cell granulation lymphocyte leukemia.) Invaded type spontaneous killer cell leukemia, adult T-cell lymphoma and leukemia (HTLV1+), A nasal form paragraph extraversion NK/T cell lymphoma, a ***** type T cell lymphoma, a **** type gamma-delta T cell lymphoma, A T cell and spontaneous killer cell nature tumors, such as a hypodermic phlegmon Mr. T cell lymphoma, mycosis fungoides / Sezary syndrome, an anaplasia nature large-sized cell lymphoma (T/null cell, a primary skin undifferentiated type), a peripheral T cell lymphoma that does not belong to a section at others, and a blood vessel immunoblast T cell lymphoma; Hodgkin lymphomas, such as a **** lymphocyte superior Hodgkin lymphoma and a classical Hodgkin's lymphoma (a tuberosus sclerosis Hodgkin lymphoma (grades 1 and 2), a lymphocyte rich classical Hodgkin's lymphoma, a mixed cellularity Hodgkin's lymphoma, a lymphocyte depletion Hodgkin lymphoma) (Hodgkin's disease);

Although ** can be mentioned, it is not limited in particular.

[0051]

The SHP1 gene-product fixed-quantity process in this invention, Especially if it is the method of doing either [at least / a fixed quantity of] SHP1 protein in a sample sample, or SHP1mRNA, are not limited, but specifically, The method (mRNA assay) of quantifying SHP1mRNA can be conveniently used by detecting the manifestation of mRNA of the method (protein assay) of quantifying SHP1 protein using SHP1 antibody which uses SHP1 protein as an antigen, and SHP1 gene.

[0052]

First, as the more concrete technique of the above-mentioned protein assay, The western blotting method or enzyme-labeled antibody technique (Immunochemistry) using SHP1 antibody (an immunohistochemical method, an immunocytochemistry method, the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) method) can be mentioned.

[0053]

SHP1 antibody used with the above-mentioned protein assay, It is not what will be limited especially if it is an antibody which recognizes at least a part of structures of SHP1 protein of having the structure shown in drawing 22, drawing 23, and the array number 4, as an antigenic determinant, and can detect SHP1 protein certainly immunologically, It may be a polyclonal antibody and may be a monoclonal antibody.

[0054]

The SHP1 above-mentioned antibody may be conventionally manufactured by a publicly known method, and SHP1 commercial antibody may be used for it. As a manufacturing method of

SHP1 antibody, if it is a monoclonal antibody, the technique produced by the hybridoma with which it makes it come to unite the mouse spleen lymphocytes which carried out immunity in SHP1 protein, and the marrow cells of a mouse will be mentioned, for example. If the SHP1 above-mentioned antibody is a polyclonal antibody, the technique refined from the immune serum of the rabbit which carried out immunity in SHP1 protein will be mentioned. #SH-PTP1(D-11):sc7289 and #SH-PTP1(C-19):sc287 (product made from Santa Cruz Biotechnology Inc.), as SHP1 commercial antibody, # anti SHPTP (06117) and #anti mouse SHPTP (05281) (Product made from Upstate Biotechnology Inc.) etc. -- it is mentioned.

[0055]

The enzyme-labeled antibody technique (an immunohistochemical method, an immunocytochemistry method, the ELISA method) using the SHP1 above-mentioned antibody, A conventionally publicly known method (for example, it, and) [Kazuo-Nakane/ "enzyme-labeled-antibody-technique"-Keiichi-Watanabe and /-] Interdisciplinarity plan publication (Showa 61) and Brown R.W. et al: Modern Pathol.199;8 (5) The method currently indicated by articles, such as 515-20 (1995), can be used conveniently, Neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited.

[0056]

Similarly the western blotting method using the SHP1 above-mentioned antibody, a conventionally publicly known method (for example, editing besides "experiment operation blotting method" Yoshiyuki Hino.) a soft science company (Showa 62) and Towbin H. et al: Proc.Natl.Acad.Sci.USA76-4350 (1979), etc. -- the method currently indicated by literature being used conveniently and, Neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited.

[0057]

By using the above-mentioned protein assay, SHP1 protein will be quantified using an antigen-antibody reaction. Therefore, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by a simple mechanism.

[0058]

Next, as the more concrete technique of the above-mentioned mRNA assay, The method of detecting the manifestation of mRNA of SHP1 gene using the polynucleotide which has an overall length, or its part and homology of a base sequence of the SHP1 gene cDNA shown in the array number 3 (refer to drawing 21) is mentioned, More specifically, they are a northern blotting method, a reverse transcription polymerase chain reaction method (RT-PCR), a real-time reverse transcription polymerase chain reaction method (real time RT-PCR), or RNA in. A situ hybridization can be mentioned.

[0059]

The above-mentioned northern blotting method, RT-PCR, real time RT-PCR, And RNA in A method that any method of a situ hybridization is conventionally publicly known. for example," - Molecular cloning"a laboratory manual, Sambrook J., Russell DW., and Cold Spring Harbor Lab Press. (2001). "Current protocols in molecular biology"edited by Ausubel FM et al. and John Wiley & Sons Inc. (2001) etc. -- the method currently indicated by literature. It can use conveniently and neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited.

[0060]

The above-mentioned northern blotting method and RNA in situ Theoretically in hybridization, the overall length of cDNA of SHP1 gene shown in the array number 3 or its part can be used as

a probe. The oligonucleotide which has theoretically the part and homology of cDNA of SHP1 gene shown in the array number 3 also by RT-PCR or real time RT-PCR can be used as a primer. The primer pairs specifically shown in Example 3 mentioned later or Example 4, for example can be used.

[0061]

So, what is necessary is just to detect the manifestation of mRNA of SHP1 gene in mRNA assay using the polynucleotide which has an overall length, or its part and homology of a base sequence of the SHP1 gene cDNA shown in the array number 3.

[0062]

Since SHP1mRNA which is a transcript of SHP1 gene will be quantified by using the above-mentioned mRNA assay, a mechanism simple by using the polynucleotide which has cDNA and homology of SHP1 gene as a probe or a primer -- quickness -- high -- it becomes possible specific and to detect hematopoietic organ tumor cells to high sensitivity.

[0063]

The SHP1 gene-methylation check process in this invention, Especially if it is the method that methylation of the CpG island included in the base sequence of SHP1 gene obtained from a sample sample can be checked, are not limited, but in this embodiment. For example, the method (the expedient top of explanation and restriction enzyme ascertainment are called hereafter) using a methylation sensitivity restriction enzyme including a gene cutting trial stage, a gene amplification trial stage, and the amount check stage of gene amplification can be used conveniently.

[0064]

With the methylation sensitivity restriction enzyme used by this embodiment. When cytosine is included in the base sequence which serves as a recognition object in double stranded DNA and cytosine in this base sequence is methylated, it will not be limited especially if it is a restriction enzyme which cannot cut the double stranded DNA of this base sequence.

[0065]

Specifically as the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme, HpaII, EagI, or NaeI can be mentioned, for example. Especially, HpaII can be used more preferably. Although it is the endonuclease which HpaII recognizes the base sequence of CCGG and carries out double-stranded-DNA cutting, MspI is known as a restriction enzyme which recognizes the same base sequence and cuts double stranded DNA.

[0066]

As mentioned above, HpaII cannot cut the double stranded DNA of the base sequence of methylated CCGG, but it is not concerned with the existence of methylation, but the base sequence of CCGG is recognized, and MspI can cut double stranded DNA. That is, MspI is a methylation insusceptible restriction enzyme. So, by using HspII and MspI together, it can become possible to use as control for checking cutting of SHP1 gene in a sample sample certainly, and the reliability of the restriction enzyme ascertainment in this embodiment can be further raised so that it may mention later.

[0067]

Thus, in the restriction enzyme ascertainment in this embodiment, it is preferred to use the methylation insusceptible restriction enzyme which recognizes the same base sequence as the methylation sensitivity restriction enzyme to be used as control. Of course, it cannot be overemphasized that the combination of methylation sensitivity and a methylation insusceptible restriction enzyme is not what is limited to above-mentioned HspII-MspI.

[0068]

Next, the check of methylation of SHP1 gene by the SHP1 gene-methylation check process in this embodiment, i.e., restriction enzyme ascertainment, is explained concretely.

[0069]

First, it processes with the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes the base sequence which includes for cytosine the genetic material obtained from said sample sample containing a hematopoietic organ cell as a gene cutting trial stage. In this stage, cutting of SHP1 gene contained by processing of a methylation sensitivity restriction enzyme in a genetic material is tried. That is, if the hematopoietic organ cell contained in said sample sample is only a normal cell, SHP1 gene will be cut, but if hematopoietic organ tumor cells are contained, since CG arrangement is methylated, SHP1 gene will not be cut.

[0070]

From said sample sample, the method of preparing a genetic material can especially use a publicly known method conventionally, and is not limited. The prepared genetic material should just contain SHP1 gene, and other ingredients may be contained unless restriction enzyme processing, PCR, etc. are checked. So, what is necessary is just a mixture of various DNAs or RNA extracted from the hematopoietic organ cell contained in said sample sample, or other cells. It is not limited in particular for processing by a methylation sensitivity restriction enzyme, and what is necessary is just to set up conditions etc. suitably according to the kind of this methylation sensitivity restriction enzyme, the state of the prepared genetic material, etc.

[0071]

Next, PCR is carried out using the primer which amplifies the field which is included in the base sequence of the SHP1 above-mentioned gene as a gene amplification trial stage to the genetic material processed with the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme, and includes the base sequence by which recognition cutting is carried out in the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme. In this stage, amplification of only SHP1 gene is tried by carrying out PCR processing of the restriction enzyme treatment object processed with the methylation sensitivity restriction enzyme using the above-mentioned primer. If it is only SHP1 normal gene, since the field inserted into primer pairs is cut, SHP1 gene cannot be amplified, but if SHP1 gene methylated is contained, since the field inserted into the above-mentioned primer pairs is not cut, SHP1 gene will be amplified.

[0072]

What is necessary is just the polynucleotide which amplifies the field which includes the base sequence recognized by the methylation sensitivity restriction enzyme as the above-mentioned primer used in the above-mentioned gene amplification trial stage. So, it is not limited in particular for the design condition of a primer. The primer pairs used by this embodiment fundamentally, Even if there are few fields including the above-mentioned base sequence recognized by the methylation sensitivity restriction enzyme, it is located outside, What is necessary is just a partial base sequence included in the base sequence of SHP1 gene shown in the array number 1 or 2 (refer to drawing 1 - drawing 10 and drawing 11 - drawing 20), or the polynucleotide which has this partial base sequence and complementarity, and it is not limited in particular for that place, size, etc.

[0073]

Next, the quantity of the amplified gene is checked as an amount check stage of gene amplification. In this stage, it is checked whether SHP1 gene has been amplified. If SHP1 gene is amplified, hematopoietic organ tumor cells will be contained in the original sample sample.

[0074]

Although not limited especially as the check method of the existence of SHP1 gene used in the above-mentioned amount check stage of gene amplification, since the technique of checking the amplifying amount of a gene by comparing with a marker using an electrophoresis method is a most common and established technique, it can use preferably. Blotting of the DNA band obtained after electrophoresis may be carried out to a membrane, and it may be detected.

[0075]

Although not limited especially as the check method of the existence of SHP1 gene used in the above-mentioned amount check stage of gene amplification, Since the technique of checking the amplifying amount of a gene using an electrophoresis method is a most common and established technique after reacting using a methylation positivity and methylation negative control DNA simultaneously with a sample sample, it can use preferably. Blotting of the DNA band obtained after electrophoresis may be carried out to a membrane, and it may be detected.

[0076]

SHP1 gene should just be used for the methylation positivity of the SHP1 above-mentioned gene, and methylation negative control DNA, and they are not limited in particular. The DNA solution which has the concentration of the grade which can measure an amplifying amount specifically obtained by processing with a methylation sensitivity restriction enzyme or a methylation insensitive restriction enzyme can be mentioned.

[0077]

It is desirable, when the same sample sample is processed with a methylation insensitive restriction enzyme and it is checked in the amount check stage of gene amplification in parallel to processing by a methylation sensitivity restriction enzyme as control in the SHP1 gene-methylation check process by restriction enzyme ascertainment. That is, it is dramatically preferred to use the restriction enzyme in which the methylation restriction enzyme [susceptible] which recognizes the same base sequence is known as a methylation sensitivity restriction enzyme in the above-mentioned gene cutting trial stage. This can raise the certainty of methylation of SHP1 gene by restriction enzyme ascertainment.

[0078]

The SHP1 satellite LOH check process in this invention, Especially if it is the method that the existence of heterozygosity loss (it abbreviates to Loss of heterozygosity and LOH) of SHP1 gene contained in this sample sample can be checked in the sample sample containing a hematopoietic organ cell, are not limited, but specifically, The Microsatellite marker which puts SHP1 gene, Or about gene polymorphism (polymorphism) like the simple nucleotide polymorphism (single nucleotide polymorphism, SNP) which exists the inside of the above-mentioned SHP gene, and near it. The method of checking LOH in the fragmentation analysis using PCR can be used conveniently.

[0079]

About the Microsatellite marker which exists in the both sides of the SHP1 above-mentioned gene, and the gene polymorphism which exists in SHP1 gene and near it. Although not the thing limited especially but what kind of marker may be used, specifically, D12S336 marker and D12S356 marker can be mentioned, for example. The base sequence of these markers is acquired from the Internet genome database (URL:<http://gdbwww.gdb.org/>). Among these markers, D12S356 marker exists in the telomere side, and is in the distance of about 4.4 cM(s) from SHP1 gene. On the other hand, D12S336 marker exists in the centromere side, and is in the distance of about 2.4 cM(s) from SHP1 gene.

[0080]

When checking LOH (heterozygosity loss) of SHP1 gene in a sample sample, the sample sample used by a SHP1 satellite LOH check process should just be a sample sample containing a hematopoietic organ cell. What is necessary is just to conduct Microsatellite analysis which detects at least one overall length of each above-mentioned marker, or its part by an PCR reaction, as shown in Example 6 mentioned later although the concrete method in particular of LOH is not limited. In particular the conditions besides an PCR reaction at this time are not limited, either, and as a primer for PCR, For example, what is necessary is for what is necessary just to be a primer which can detect at least some of D12S336 markers or D12S356 markers, and just to set up conditions relevant also about other conditions suitably.

[0081]

The sample sample used by the SHP1 satellite LOH check process in this invention will not be limited especially if it is a sample sample containing a hematopoietic organ cell. As contrast, the sample sample in particular to be used is not limited, either, the sample obtained after complete hematological remission may be used, and other normal tissue cells may be used.

[0082]

Thus, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells more certainly by a simple mechanism by checking LOH of SHP1 gene using gene polymorphism, such as a Microsatellite marker and SNP.

[0083]

Although the example which checked LOH of SHP1 gene using a Microsatellite marker and gene polymorphism is given in this embodiment, If this invention is a method which it is not limited to this and LOH of SHP1 gene can check, it cannot be overemphasized that what kind of method may be used.

[0084]

Next, a desirable example of the detecting method concerning this embodiment is explained more concretely.

[0085]

First, at least SHP1 protein contained by the SHP1 gene-product fixed-quantity process in a sample sample using the technique mentioned above or SHP1mRNA either is quantified. When SHP1 protein quantified in this process is decreasing in number more nearly substantially than a standard or SHP1 gene product is hardly revealed, a possibility that hematopoietic organ tumor cells are contained in the sample sample becomes high.

[0086]

Next, methylation of the CpG island included by said restriction enzyme ascertainment by a SHP1 gene-methylation check process in the base sequence of SHP1 gene in the genetic material prepared from the sample sample is checked. In the following explanation, the example which used said HpaII as a methylation sensitivity restriction enzyme is given. Although the base sequence of CCGG is recognized to have mentioned above, HpaII is preferably used, in order that the methylation insusceptible restriction enzyme MspI may recognize the same base sequence.

[0087]

So, in a gene cutting trial stage, the genetic material obtained from the above-mentioned sample sample is processed by HpaII. Simultaneously, it is desirable when the same genetic material is processed by MspI. By this, positive control that a CCGG base sequence is cut can be obtained.

[0088]

Next, although it shifts to a gene amplification trial stage, in this step, the primer for PCR is previously set up across the recognition site (CCGG) of HpaII/MspI from the base sequence (refer to the array numbers 1 and 2, drawing 1 - drawing 10 and drawing 11 - drawing 20) of SHP1 gene. The primer pairs specifically shown in Example 1 mentioned later or Example 2, for example are used.

[0089]

Using the above primers, PCR is carried out to the genetic material processed by HpaII, it is the amount check stage of gene amplification, and the amplifying amount of an PCR product is checked, for example by electrophoresis. Since HpaII cannot be cut if SHP1 methylated gene is in a genetic material, the PCR product of the target size is detectable by PCR. On the other hand, without SHP1 methylated gene, DNA is cut by HpaII and an PCR product cannot be detected.

[0090]

Thus, if the above-mentioned restriction enzyme ascertainment is used, after trying cutting of SHP1 gene contained in the genetic material obtained from the sample sample using the methylation sensitivity restriction enzyme and amplifying using PCR further, the amplifying amount of the PCR product acquired can be checked. So, if even a little SHP1 genes are obtained from a sample sample, it is possible to detect methylation of SHP1 gene. Therefore, even if hematopoietic organ tumor cells exist very much in a sample sample only in the minute amount, it is promptly high detection sensitivity, and it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target moreover.

[0091]

There is that no other process (process) and other stages (step) may be included in the above-mentioned detecting method explained by this embodiment also until it says. For example, in the SHP1 gene-methylation check process, in order to advance a restriction enzyme reaction and an PCR reaction smoothly, the refined stage which refines the genetic material etc. which were obtained may be included.

[0092]

The detection kit for enforcing not only the hematopoietic organ tumor cell detection method mentioned above but this detecting method is contained in this invention. Specifically, the composition containing said SHP1 antibody, said methylation sensitivity restriction enzyme, said each primer, said SHP1 gene positivity, methylation negative control DNA, etc. can be mentioned. It is desirable when it divides into the combination of (1) above-mentioned SHP1 antibody and (2) methylation-sensitivity restriction enzyme, the primer for PCR, and said SHP1 gene positivity and methylation negative control DNA especially, and either [at least] (1) or (2) are contained. Whichever of the turn of a SHP1 gene-product fixed-quantity process and a SHP1 gene-methylation check process may be the point.

[0093]

Other various reagents may be contained in the above-mentioned detection kit if needed. For example, at least one side of reagents for a restriction enzyme reaction, such as reagents for an PCR reaction, such as a nucleotide monomer, polymerase, and a buffer, and a buffer, may be contained.

[0094]

The reagent etc. which are used for every process or stage are explained more concretely. First, in a gene product fixed-quantity process, even if it is any of an enzyme-labeled antibody technique and a western blotting method in the case of protein assay, SHP1 antibody and its detecting reagent are used at least. In the case of mRNA assay, they are a RT-PCR assay and real

time. When using a RT-PCR assay, the primer for SHP1cDNA detection and a Taq DNA polymerase reaction reagent are used at least.

[0095]

Next, in the SHP1 gene-methylation check process in this embodiment, in order to check methylation with a methylation sensitivity restriction enzyme, a methylation sensitivity restriction enzyme, methylation insensitive restriction enzymes, and these reaction reagents are first used at least in a gene cutting trial stage. Next, in a gene amplification trial stage, a primer, a Taq DNA polymerase reaction reagent, and SHP1 gene-methylation positive DNA for system studies are used at least. Next, in the amount check stage of gene amplification, the reaction product which used the SHP1 gene-methylation positivity and methylation negative control DNA can be used at least as control of electrophoresis.

[0096]

Thus, in the detection kit concerning this invention, in order to enforce the hematopoietic organ tumor cell detection method mentioned above, desirable drugs, a specimen, etc. are contained. Therefore, the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention can be enforced easily and simply by using the above-mentioned detection kit, and it becomes possible to use this invention on industrial levels, such as clinical laboratory test industry and pharmaceutical industry.

[0097]

[Embodiment 2]

It will be as follows if other gestalten of the operation in this invention are explained based on drawing 25 thru/or drawing 47. This invention is not limited to this. The explanation of explanation which overlaps with Embodiment 1 for convenience is omitted suitably.

[0098]

Although the restriction enzyme ascertainment which uses a methylation sensitivity restriction enzyme for a SHP1 gene-methylation check process was used in said Embodiment 1, This invention is not limited to this and the method (the expedient top of explanation and a DNA modification method are called hereafter) of embellishing DNA using a bisulfite including a gene ornamentation stage and a methylation cytosine content judging stage can be conveniently used for it by this embodiment, for example.

[0099]

Cytosine will be changed into uracil if DNA is processed by a bisulfite (Bisulfite). As shown in drawing 25, cytosine is specifically sulfonated by the bisulfite (Sulphonation), Furthermore it is deaminated by hydrolysis (Hydrolytic deamination) and is further changed into uracil by the desulfonation (Alkali desulphonation) under alkali existence. This uracil places and changes to thymine after PCR. On the other hand, the methylated cytosine (5'-methylcytosine) is not changed by a bisulfite. So, in this embodiment, using the difference in the base sequence after this bisulfite processing, the existence of methylation of SHP1 gene is detected so that it may mention later.

[0100]

Next, the check of methylation of SHP1 gene by the SHP1 gene-methylation check process in this embodiment, i.e., a DNA modification method, is explained concretely.

[0101]

First, the genetic material obtained from said sample sample containing a hematopoietic organ cell as a gene ornamentation stage is processed by a bisulfite. In this stage, since only the cytosine which is not methylated is changed into uracil as mentioned above, if bisulfite

processing of the DNA is carried out, as shown in drawing 26, so, the methylated cytosine (M enclosed with a figure middle circle shows) remains with cytosine, for example, but. The cytosine which is not methylated is changed into uracil (U).

[0102]

Especially as a bisulfite used in the above-mentioned gene ornamentation stage, although not limited, sodium bisulfite (it is also called $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, the sodium metabisulfite, sodium disulfite, or sodium pyrosulfite) can be used conveniently, for example. Urea may be used together with a heavy sulfurous acid compound.

[0103]

Next, the existence of cytosine in the base sequence of SHP1 gene contained in the genetic material processed by the bisulfite as a methylation cytosine content judging stage is judged. That cytosine is contained in SHP1 gene in a bisulfite treatment object, the methylated cytosine will be contained in SHP1 gene before processing. So, if cytosine exists, hematopoietic organ tumor cells will be contained in the original sample sample.

[0104]

Although not limited especially as a method of judging the existence of cytosine in the base sequence of SHP1 gene carried out in the above-mentioned methylation cytosine content judging stage, specifically, 1) Which technique can be preferably used at least among the way PCR detects methylation cytosine, the way the determination of the base sequence of a gene detects 2 methylation cytosine, or the method of identifying the base sequence containing 3 methylation cytosine.

[0105]

More specifically, methylation specific PCR (Methylation Specific PCR) can be first mentioned as a way PCR detects 1 methylation cytosine.

[0106]

The above-mentioned methylation specific PCR method is specific to methylated DNA, and sets up as a primer a base sequence including CG arrangement. If the methylated cytosine exists, amplification will become possible by PCR, and SHP1 gene so methylated can be detected.

[0107]

A publicly known method (for example, the method of Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9821-9826 (1996), etc. currently indicated by literature) can be conventionally used for the above-mentioned methylation specific PCR method conveniently, and The concrete process and reagents, Conditions in particular are not limited. In the refining processes of DNA, if the primer which could use the method etc. which used the ethanol precipitation method and the Glassbeads method, and carried out the fluorescence label is used, detection of PCR can be made easy.

[0108]

Next, in sequencing of the way, i.e., SHP1 gene, the determination of the base sequence of two genes detects methylation cytosine, a primer is set as the field which does not include CG arrangement, and PCR is carried out. In the PCR product acquired, that (it exists with CG arrangement) by which it is methylated, and the thing (changed into TG arrangement) which is not methylated may be contained. Existence of CG arrangement, i.e., methylation, is considered by carrying out sequencing of this.

[0109]

A method that sequencing of the SHP1 above-mentioned gene is also conventionally publicly known. (For example, the method currently indicated by the literature of Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 1827-1831 (1992), etc.) can be used conveniently, and neither in particular the concrete

process, nor reagents, conditions, etc. are limited. It is also possible to use the primer which has specific arrangement (CG arrangement is included) for methylated DNA as the above-mentioned primer.

[0110]

Since PCR is used, this method can also detect methylation of SHP1 gene, if even a little SHP1 genes are obtained from a sample sample. Therefore, even if hematopoietic organ tumor cells exist very much in a sample sample only in the minute amount, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by high detection sensitivity. Since concrete arrangement is determined by using sequencing, it also becomes possible to clarify the grade of methylation more.

[0111]

Next, as a method of identifying the base sequence containing 3 cytosine, the Ms-SnuPE method, the bisulfite SSCP method, the methyl light method, a fluorescence dissolution curvilinear analysis method, the COBRA method, etc. can be mentioned.

[0112]

The describing [above] Ms-SnuPE (Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension) method is a method of carrying out PCR using a specific primer to methylated DNA. However, since the existence of methylation in the field inserted into the primer is not known, the polynucleotide which adjoins CG arrangement to detect is created and it is made to anneal with an PCR product. If ^{32}P -dCTP is incorporated when DNA is compounded under existence of radioisotope, the cytosine methylated since it is CG arrangement there will exist. Since it is TG arrangement there, it means that methylation was not carried out on the other hand if ^{32}P -dTTP was incorporated when DNA is compounded.

[0113]

A publicly known method (for example, the method of Nucleic Acids Research 25, 2529-2531 (1997), etc. currently indicated by literature) can be conventionally used for the describing [above] Ms-SnuPE method conveniently, Neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited.

[0114]

The describing [above] bisulfite SSCP (Bisulfite-SSCP) method does not understand the existence of methylation in the field inserted into the primer, either, although it is the method of carrying out PCR using a specific primer to methylated DNA. Then, electrophoresis of the PCR product is carried out after denaturalizing to single-strand DNA using the SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism) method, and the grade of methylation of SHP1 gene is judged from the difference in the mobility of single-strand DNA.

[0115]

The describing [above] bisulfite SSCP method can also use conveniently conventionally a publicly known method (for example, the method of Electrophoresis 21, 904-908 (2000), etc. currently indicated by literature), and neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited.

[0116]

To others, the methyl light (Methyl-light) method, the fluorescence dissolution curvilinear analyzing (FluorescenceMelting Curve Analysis) method, etc. are mentioned. No these methods also understand the existence of methylation in the field inserted into the primer, although it is the method of carrying out PCR using a specific primer to methylated DNA. then -- the field which wants to investigate the inside -- methylation -- the quantity of methylation in the above-

mentioned PCR product is judged by creating specific polynucleotide and examining how much [the PCR product which this methylation specific polynucleotide made the single strand, and] an annealing (2 chain polymerization) reaction is carried out.

[0117]

The methyl light describing [above] method specifically, for example Nucleic Acids Research 28 (8), E32 (2000), etc. -- the method currently indicated by literature -- the above-mentioned fluorescence dissolution curvilinear analysis -- concrete -- Clinical Chemistry 47 and 1183-1189 (2001), etc. -- the method currently indicated by literature can be used conveniently.

[0118]

Since PCR is used, the all directions method mentioned above can detect methylation of SHP1 gene, if even a little SHP1 genes are obtained from a sample sample. Therefore, even if hematopoietic organ tumor cells exist very much in a sample sample only in the minute amount, it becomes possible to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target by high detection sensitivity.

[0119]

The describing [above] COBRA method () [Combined Bisulfite Restriction Analysis and] Or if CGCG arrangement has received [being called Bisulfite PCR followed by restriction analysis etc. and] methylation, for example, after heavy sulfite treating remains with CGCG arrangement, but. It will be changed into TGTG arrangement if not methylated. Then, by using the restriction enzyme etc. which cut only the above-mentioned CGCG arrangement, the band pattern on electrophoretic gel can be analyzed, and the existence of methylation of SHP1 gene can be judged and quantified.

[0120]

The describing [above] COBRA method can also use conveniently conventionally a publicly known method (for example, the method of Nucleic Acids Research 25-2532-2534 (1997) etc. currently indicated by literature), Neither in particular the concrete process, nor reagents, conditions, etc. are limited. Of course, the advantage by PCR mentioned above is not only acquired, but [since PCR is used also by this method,] since restriction enzyme processing and electrophoresis are used, if even the analysis of a band pattern is clarified, there is an advantage that methylation of SHP1 gene can be checked easily.

[0121]

Thus, by the DNA modification method in this embodiment, although PCR is used in the methylation cytosine content judging stage, the designing method of a primer used by this PCR is explained below.

[0122]

As mentioned above, if bisulfite processing of the DNA is carried out, cytosine will be changed into uracil, but the methylated cytosine is saved, without being changed. Here, the cytosine which may receive methylation by intracellular is cytosine (C) of CG arrangement (5'-CG-3') located in a line with CG from the 5' arrangement side. Therefore, all cytosine other than the above-mentioned CG arrangement will be changed into thymine (T) by bisulfite processing. Then, all the CG arrangement changes the base sequence of SHP1 gene as what received methylation, and sets up a primer. Uracil in DNA will be recognized as thymine and will be replaced by thymine by PCR.

[0123]

First, the conditions about the DNA strand which plans a primer are set up. In the base sequence of SHP1 gene, either a sense strand or an antisense strand assumes the arrangement from which

all cytosine in other base sequences was changed into thymine noting that only the above-mentioned CG arrangement receives methylation.

[0124]

. The base sequence shown in drawing 27 - drawing 36, and the array number 5 specifically corresponds to the sense strand of the genomic DNA (wild type) of SHP1 gene shown in drawing 1 - drawing 10, and the array number 1. It is a base sequence (it is hereafter considered as sense strand conversion arrangement on [of explanation] expedient) after bisulfite processing. . Correspond for the base sequence shown in drawing 37 - drawing 46, and the array number 6 to consider it as the antisense strand of the genomic DNA (wild type) of SHP1 gene shown in drawing 11 - drawing 20, and the array number 2. It is a base sequence (it is hereafter considered as antisense strand conversion arrangement on [of explanation] expedient) after bisulfite processing. These sense strand conversion arrangement and antisense strand conversion arrangement become less complementary by bisulfite processing.

[0125]

The base sequence of drawing 27 - drawing 36, the array number 5 and drawing 37 - drawing 46, and the array number 6, When it is assumed that CG arrangement is methylated 100%, it is a base sequence as what received bisulfite processing, and since it is not thought that 100% of methylation arises in a cell actually, it illustrates as a base sequence as a possibility that it can detect in this invention.

[0126]

And a forward primer (FW primer) and a reverse primer (RV primer) are created to the (I) above-mentioned sense strand conversion arrangement, or FW primer and RV primer are created to the (II) above-mentioned antisense strand conversion arrangement. In this case, primer arrangement differs also at the same place, respectively.

[0127]

Next, the conditions about the field which plans a primer are set up. (i) In order to amplify what created the primer to the base sequence including CG arrangement, or was (ii)-methylated in order to amplify only methylated DNA by PCR directly, and the thing which is not carried out by PCR fair, create a primer to the arrangement which does not include CG field. When it is (ii), the method of sequencing or others is enforced later and methylation is judged.

[0128]

Therefore, there are four kinds of designing methods which multiplied condition (i) and condition (ii) about condition (I) about the above-mentioned DNA strand and condition (II), and a field in the design of the primer used by a DNA modification method.

[0129]

Here, in (i), if the place of the primer has received methylation with sufficient convenience, it will be detected, but when only the adjacent area instead of a place have received methylation, it becomes undetectable although methylation exists. Then, methylation of SHP1 gene is certainly detectable by authorizing the existence of the methylation in the field which was not concerned with the existence of methylation but was surrounded by each primer after amplification by PCR like (ii), i.e., CG arrangement. Therefore, the information of not only the place of the primer for detection but a gene sequence itself becomes important for the judgment of methylation of SHP1 gene in this embodiment.

[0130]

If CG arrangement is not methylated, will be changed into TG arrangement by bisulfite processing, but. The primer (Unmethylated primer) created to a base sequence including this TG

arrangement can be used as control proving existence of DNA which has not received methylation. When bisulfite processing is insufficient, SHP1 gene of the wild type from which cytosine is not changed into uracil will mix. Then, the primer (Wild type primer) which has a wild type base sequence can be used as control of whether bisulfite processing was made thoroughly enough.

[0131]

In the methylation cytosine content judging stage mentioned above. The method same to the check of the gene amplified by PCR as the amount check stage of gene amplification in said Embodiment 1, For example, by comparing with a marker using an electrophoresis method, the amplifying amount of a gene is checked or the technique of having ****ed enough blotting of the DNA band further obtained after electrophoresis to the membrane, and carrying out it is mentioned. Of course, it is not limited to these techniques, and a publicly known technique can be conventionally used conveniently also about the above-mentioned electrophoresis method or the method of blotting, and it is not limited in particular.

[0132]

As long as it puts in another way, the amount check stage of gene amplification as well as the case where it is based on the restriction enzyme ascertainment in said Embodiment 1 may be included also by the SHP1 gene-methylation check process by the DNA modification method in this embodiment.

[0133]

Next, a desirable example of the detecting method concerning this embodiment is explained more concretely.

[0134]

First, either [at least] SHP1 protein contained by the SHP1 gene-product fixed-quantity process in a sample sample using the technique mentioned above or SHP1mRNA is quantified. When SHP1 protein quantified in this process is decreasing in number more nearly substantially than a standard or SHP1 gene product is hardly revealed, a possibility that hematopoietic organ tumor cells are contained in the sample sample becomes high.

[0135]

Next, methylation of the CpG island included by said DNA modification method by a SHP1 gene-methylation check process in the base sequence of SHP1 gene in the genetic material prepared from the sample sample is checked. specifically, the genetic material obtained from the above-mentioned sample sample is come out of and processed in a gene ornamentation stage using sodium bisulfite.

[0136]

Next, although it shifts to a gene amplification trial stage, in this step, the primer for PCR is set up based on the designing method of the primer mentioned above.

[0137]

By methylation specific PCR, as shown in drawing 47 (a), specifically, suppose that CG arrangement of wild type DNA has methylation 100% supposing wild type DNA (for figure Nakagami, the bottom is an antisense strand at a sense strand) of 23 base pairs. When bisulfite processing is carried out, it becomes in this case, less complementary in a sense strand and an antisense strand, as shown in drawing 47 (b). Then, as shown in drawing 47 (c) or (d), FW primer and RV primer are created to a sense strand or an antisense strand.

[0138]

In above-mentioned methylation specific PCR, the primer pairs specifically shown in Example 4

mentioned later or Example 5, for example are used as a primer for PCR. Using the above primers, methylation specific PCR is carried out to the genetic material processed with sodium bisulfite, for example, the amplifying amount of an PCR product is checked by electrophoresis. [0139]

Thus, if the describing [above] DNA modification method is used and the genetic material obtained from the sample sample using the bisulfite will be processed, cytosine in a base sequence will be changed into uracil, but the methylated cytosine is not changed. Therefore, methylation of SHP1 gene is detectable only by judging whether cytosine is contained in the base sequence of SHP1 gene after a gene ornamentation stage. Therefore, it becomes possible quick by a simple mechanism and to detect hematopoietic organ tumor cells on a high unique target.

[0140]

Next, either [at least] SHP1 protein contained by the SHP1 gene-product fixed-quantity process in a sample sample using the technique mentioned above or SHP1mRNA is quantified. When SHP1 gene products quantified in this process are decreasing in number more nearly substantially than a standard or are hardly revealed, a possibility that hematopoietic organ tumor cells are contained in the sample sample becomes high.

[0141]

Like the detecting method of said Embodiment 1, there is that no other process (process) and other stages (step) may be included in the above-mentioned detecting method explained by this embodiment also until it says.

[0142]

The detection kit for enforcing not only the hematopoietic organ tumor cell detection method mentioned above but this detecting method is contained in this invention. The composition which specifically contains the bisulfite refined to the gene processing level, said primer, and said SHP1 antibody can be mentioned. In the detection kit concerning this invention, the above-mentioned bisulfite, a primer, and SHP1 antibody That is, (1) above-mentioned SHP1 antibody and (2) bisulfites, The primer for a judgment of the existence of cytosine in the base sequence of SHP1 gene contained in the genetic material processed by this bisulfite, And when it divides into the primer for PCR which detects the overall length of a base sequence, or its part of SHP1 gene cDNA shown in the (3) array number 3, it is preferred that any at least one of (1), (2), and (3) is included.

[0143]

The probe for Northern blotting which has an overall length, or its part and homology of a base sequence of the SHP1 gene cDNA shown in the array number 3 in the above-mentioned detection kit, Or the marker for electrophoresis using the methylation positivity of a restriction enzyme and SHP1 gene and methylation negative control DNA which recognize the base sequence containing cytosine may be included, At least one side of reagents for a restriction enzyme reaction, such as reagents for an PCR reaction, such as a nucleotide monomer, polymerase, and a buffer, and a buffer, may be contained.

[0144]

The reagent etc. which are used for every process or stage are explained more concretely. First, in a gene product fixed-quantity process, since it is the same as that of what was mentioned as the example by said Embodiment 1, the explanation is omitted.

[0145]

Next, in the SHP1 gene-methylation check process in this embodiment, in order to check

methylation by bisulfite processing, reagents, such as various bisulfites, are first used at least in a gene ornamentation stage. Next, in a methylation cytosine content judging stage, when using how PCR detects methylation cytosine, methylation arrangement specific primers and a TaqDNA polymerase reaction reagent are used at least. moreover -- the way the determination of the base sequence of a gene detects methylation cytosine, or the method of recognizing the base sequence containing cytosine -- each -- publicly known reagents are used according to a concrete method.

[0146]

Thus, in order to enforce the hematopoietic organ tumor cell detection method mentioned above like [the detection kit concerning this embodiment] the detection kit of said Embodiment 1, desirable drugs, a specimen, etc. are contained. Therefore, the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention can be enforced easily and simply by using the above-mentioned detection kit, and it becomes possible to use this invention on industrial levels, such as clinical laboratory test industry and pharmaceutical industry.

[0147]

This invention is not what is limited to each embodiment mentioned above, It cannot be overemphasized that it is contained in the technical scope of this invention also about the embodiment obtained by embodiment which various change is possible and is different in the range shown in the claim combining suitably the technical means indicated, respectively.

[0148]

EXAMPLE

[Example]

Hereafter, the concrete example of this invention is described based on drawing 48 thru/or drawing 52. This invention is not limited to this.

[0149]

[Example 1]

In accordance with Towbin H. et al:Proc.Natl.Acad.Sci.USA76-4350 and the method currently indicated by (1979), Western blotting was carried out using the sample sample containing a spontaneous killer cell lymphoma. #SH-PTP1(D-11):sc7289 (product made from Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used as SHP1 antibody (a SHP1 gene-product fixed-quantity process and protein assay).

[0150]

Then, it shifted to the SHP1 gene-methylation check process. First, the genetic material prepared from the above-mentioned sample sample was processed in 37 ** 4 hours, using HpaII as a methylation sensitivity restriction enzyme (gene cutting trial stage).

[0151]

Next, the genetic material processed by HpaII was amplified by PCR (gene amplification trial stage). The Pullar **-**** used at this time was taken as the combination of primer REP-S1 of 19 bases shown in the array number 7 and drawing 48 (a), and primer REP-AS1 of 20 bases shown in the array number 8 and drawing 48 (b). When these primer pairs are used, as shown in the array number 9 and drawing 48 (c), the base sequence of 126 bases from 7441 bases in the arrangement (refer to the array number 1 and drawing 1 - drawing 10) of the sense strand of SHP1 gene to 7566 bases is detected.

[0152]

"# (number)" in the parenthesis in drawing 48 (c) shows the position of the base in the sense strand of the SHP1 above-mentioned gene, and the underline part shows the correspondence position of primer REP-S1 and REP-AS1, and the position of the recognition cleavage site of HpaII. Primer REP-AS1 is designed to the arrangement of the antisense strand in the field of the underline part of above-mentioned REP-AS1.

[0153]

Then, after carrying out electrophoresis by agarose gel, blotting of the obtained DNA band was carried out to the nylon membrane, and amplification of SHP1 gene was checked (the amount check process of gene amplification).

[0154]

Next, Towbin H. et al: Western blotting was carried out in accordance with Proc.Natl.Acad.Sci.USA76-4350 and the method currently indicated by (1979). #SH-PTP1(D-11):sc7289 (product made from Santa Cruz Biotechnology Inc.) was used as SHP1 antibody (a SHP1 gene-product fixed-quantity process and protein assay).

[0155]

The hematopoietic organ tumor cells in a sample sample were detected from the result of the above-mentioned SHP1 gene-methylation check process and a SHP1 gene-product fixed-quantity process.

[0156]

[Example 2]

Primer REP-S2 of 21 bases shown in the array number 10 and drawing 49 (a) as primer pairs in a gene amplification trial stage, The existence of the hematopoietic organ tumor cells in a sample sample was detected like said Example 1 except having used the combination of primer REP-AS2 of 21 bases shown in the array number 11 and drawing 49 (b).

[0157]

When the above-mentioned primer pairs are used, as shown in the array number 12 and drawing 49 (c), the base sequence of 227 bases from 6858 bases in the arrangement (refer to the array number 1 and drawing 1 - drawing 10) of the sense strand of SHP1 gene to 7084 bases can be detected.

[0158]

"# (number)" in the parenthesis in drawing 49 (c) shows the position of the base in the sense strand of the SHP1 above-mentioned gene, and the underline part shows the correspondence position of primer REP-S2 and REP-AS2, and the position of the recognition cleavage site of HpaII. Primer REP-AS2 is designed to the arrangement of the antisense strand in the field of the underline part of above-mentioned REP-AS2.

[0159]

[Example 3]

The existence of the hematopoietic organ tumor cells in a sample sample was examined like said Example 1 except having carried out the SHP1 gene-product fixed-quantity process using the mRNA assay by RT-PCR.

[0160]

That is, after preparing RNA intracellular [all the] from said sample sample, reverse transcription was carried out with reverse transcriptase. Then, it amplified by PCR using SHP1 specific primer pairs. As the above-mentioned SHP1 specific primer pairs, the combination of primer SHP-PF1 of 23 bases shown in the array number 13 and drawing 50 (a) and primer SHP-

PR1 of 25 bases shown in the array number 14 and drawing 50 (b) was used.

[0161]

[Example 4]

The existence of the hematopoietic organ tumor cells in a sample sample was examined like said Example 3 (namely, said Example 1) except having carried out the SHP1 gene-product fixed-quantity process using the mRNA assay by real time RT-PCR. As the above-mentioned SHP1 specific primer pairs, primer SHP-LR1 of 20 bases shown in primer SHP-LF1, and the array number 16 and drawing 51 (b) of 20 bases shown in the array number 15 and drawing 51 (a) was used.

[0162]

[Example 5]

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 and 9821-9826 (1996), Except having carried out the SHP1 gene-methylation check process using methylation specific PCR in accordance with the method currently indicated, The existence of the hematopoietic organ tumor cells in a sample sample was examined like said Example 1. Sodium bisulfite was used as a bisulfite.

[0163]

As primer pairs in above-mentioned methylation specific PCR, the combination of primer MF2 of 24 bases shown in the array number 17 and drawing 52 (a) and primer MR2 of 21 bases shown in the array number 18 and drawing 52 (b) can be used. When these primer pairs are used, as shown in the array number 19 and drawing 52 (c), the base sequence of 159 bases from 7037 bases in the arrangement (refer to the array number 1 and drawing 1 - drawing 10) of the sense strand of SHP1 gene to 7195 bases can be detected.

[0164]

"# (number)" in the parenthesis in drawing 52 (c) shows the position of the base in the sense strand of the SHP1 above-mentioned gene, and the underline part shows the correspondence position of the primers MF2 and MR2. However, since each above-mentioned primer is designed detect only DNA methylated, the base sequence differs from the base sequence of the above-mentioned underline part for a while. Primer MR2 is designed to the arrangement of the antisense strand in the field of the underline part of above-mentioned MR2.

[0165]

[Example 6]

As a sample sample, the bone marrow (BM) sample for diagnosis and the ALL (acute lymphoblastic leukemia) patient's peripheral blood (PB) sample were used. BM sample obtained from the ALL patient contained the blast cell by at least 70% of ratio. The control sample to these sample sample was obtained after the complete hematological remission attained by the chemotherapy.

[0166]

Microsatellite analysis was conducted using the above-mentioned sample sample. the PCR reaction at this time -- the primer by the side of 5' -- 5' -- a label being carried out by - iodoacetamidfluorescein and the system of reaction, It was considered as each dNTP of each primer of 10pmol, the genomic DNA of 40ng, a 1xPCR buffer, and 200microM, and the system of 20microl containing Taq DNAPolymerase of 0.5unit. The acquired PCR product is covered over ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA), It analyzed by Genescan Analysis software ver 3.7 (Applied Biosystems).

[0167]

As a result, as shown in drawing 53 (a) - (b), it turned out that the existence of LOH of SHP1

gene can be checked with D12S336 marker and D12S356 marker. In the result of this example, LOH was observed in 15 examples (79%) with D12S356 marker by the side of a telomere among these markers among 19 cases from which the significant result was obtained. In D12S336 marker by the side of centromere, LOH was observed in six examples (38%) among 16 cases.

[0168]

Any result of the example of the above was fully able to detect hematopoietic organ tumor cells from the sample sample. So, even if this invention did not use two or more modalities together, it turned out that hematopoietic organ tumor cells are easily and promptly detectable.

[0169]

[Effect of the Invention]

As mentioned above, the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention, The SHP1 gene-product fixed-quantity process of quantifying either [at least] SHP1 specific protein or its mRNA into the hematopoietic organ cell contained in the sample sample containing a hematopoietic organ cell, The SHP1 gene-methylation check process which checks the methylation of the CpG island included in the base sequence of SHP1 gene which encodes the SHP1 above-mentioned protein acquired from the above-mentioned sample sample, It is a method including the SHP1 gene LOH check process which checks the existence of heterozygosity loss (LOH) of SHP1 gene contained in the above-mentioned sample sample.

[0170]

As a desirable example of the hematopoietic organ tumor cell detection kit concerning this invention, (1) The methylation sensitivity restriction enzyme which recognizes the base sequence which contains in a hematopoietic organ cell SHP1 antibody which uses protein tyrosine phosphatase SHP1 specific protein as an antigen, and (2) cytosine, The primer for PCR which amplifies the field which is included in the base sequence of SHP1 gene and includes the base sequence recognized by the above-mentioned methylation sensitivity restriction enzyme, In the composition which contains at least one side the methylation positivity of the SHP1 above-mentioned gene, and among methylation negative control DNAs. Or SHP1 antibody which uses protein tyrosine phosphatase SHP1 protein specific into (1) hematopoietic organ cell as an antigen and the bisulfite refined to (2) gene processing level, The primer for a judgment of the existence of cytosine in the base sequence of SHP1 gene contained in the genetic material processed by this bisulfite, And it is used in order to detect hematopoietic organ tumor cells from the sample sample containing the composition containing any at least one of the primers for PCR which detect the overall length of a base sequence, or its part of SHP1 gene cDNA shown in the (3) array number 3, or a hematopoietic organ cell, The composition containing the primer for PCR which detects at least one overall length of two Microsatellite markers which put protein tyrosine phosphatase SHP1 specific gene between a hematopoietic organ cell, or its part can be mentioned.

[0171]

According to the method or composition of this invention, SHP1 gene expression can be judged using four-fold marker by the maximum called loss of ornamentation and mRNA of gene DNA, protein, and allele. namely, one hematopoietic organ tumor cell called a SHP1 gene-expression fall -- since a specific phenomenon can be checked in four steps, hematopoietic organ tumor cells are detectable by very high singularity. Therefore, hematopoietic organ tumor cells are easily and promptly detectable from a small amount of sample samples containing a hematopoietic organ cell by using this invention.

[0172]

So, if the high sensitivity detection system of the malignant lymphoma and leukemia in this invention is used, The monitoring after the early detection of the hematopoietic organ tumor by a general mass screening, diagnosis, and a therapy and the early detection of a recurrence become possible, and it also becomes possible to use this invention for prediction etc. of the crisis risk in blood relationship persons, such as a family who showed the symptoms of these diseases. As a result, the effect of becoming possible to use this invention on industrial levels, such as clinical laboratory test industry and pharmaceutical industry, is done so.
[0173]

<110> Japan Science and Technology Corporation

**<120> Hematopoietic malignant cell-d
lignant cell-detection kit**

<130> Y2002-P331

<160> 19

<170> Patent In Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> genomic DNA

<400> 1

ccatctagtt	gtgcccagtg	tagaccaaat	gtc
ctgcatgcgt	cctgttttggc	aaacagctgc	cca
actaccaccc	cctccaggtg	tcttaggcac	gct
actccctctt	gcagggtgtcc	ttaagttttgc	tcg
tcctgagatc	gccagcctgt	caggcaagct	gaa
gccaccccat	gggcctgctg	ctggtggcag	cgt
ttgtgccact	gccagggggag	gaaagggcctt	gat
gacttagcct	tgggtgtcagt	ctcttgcgga	cct
tccctctgcc	tttccaggcc	ccatcccccct	gaa
cctaaccctg	ccccaggggcc	taaccctacc	tga
tgagaggctg	gagtgggtcc	ctcagcgccc	tgg
ccttcctctga	ggaactgggc	tgttagggat	ttt
gagagggtttc	ccccatttgt	tgctcttctct	cag
tacccaatac	cccgccgctc	tgtcagcttg	agc
ctctcccggg	ggaaggcggc	cctggaccag	cag
gctgcaggga	agctggccgc	tgtggggcgggt	ctc

tcctggagac	tattagtcca	gggtttgtcc	ctgcagtgcc	attggcctgg	caggcaggat	1020
c g a g g a g g a a	g t g g c t g a t t	a c t g a g c g g t	t c t			
c a g c t g t g c c	g c t g g c t c a g	c c c c g c c c c c	t g c			
t a c a g a g a g a	t g c t g t c c c g	t g g g t a a g t c	c c g			
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g c t t t g t t g a	t g c			
c g a t c t g c c g	c t g c c c t g c g	c c t g t t t c c g	g t c			
g t g a g g a c c c	c c g g c t c a c t	c a t g c t c c t c	t g c			
a g t g t g t a t c	t g t t c t c t c c	a t t g c a t t t c	t a c			
c t c c t g c t t a	g g a c c t g t c c	c c c t g g g t a g	c t c			
g c c a c c c g c g	a a g g c c c t c c	c a c g t c c a g c	c a a			
t t g g t c c c a t	c t t c t t t g t t	t c c t t t c a c t	t c c			
g t a c g t g t t g	a g c a t c t a t t	a t g c a c c a g g	t g c			
g a a c a a g a c a	g a c a t g g t c t	c t g c t c t c a c	g g a			
c c g a a c a a a t	a a c c c a a t a a	a t t g g a t c a t	t g c			
t a g a c a g c c t	t g g c c g g g t g	t a g t g g t t c a	c a c			
a g g c g a g a g g	a t t g c t t g a g	c c c a g g a g t t	t g a			
c t g t c t c t a c	a a a a a a t a a g	a a a t t a g c t g	g g t			
c t a t g g a g a g	g c t a a g g t g a	g a g g c t t g c t	t g a			
g a t g a t t g c a	c c a c t g c a c a	c c a g c c t g g g	c g a			
a a a a a a a a a a	g a a a a t g a a c	c a g c t t c a t a	t g c			
a t t a c t a g c t	g g a g g g a t c a	g g g a g g c c t t	c c c			
g g a t g a g g a g	g a a g a g g a g c	t g g c c a t g t g	a c g			
g c a g a g g a g a	t g g t g a g c a c	a a a g c c c t a a	t g t			
c c c g t g g c a g	a g g a c c c t a g	t g g a g c g g a g	g c a			
a g c t a g g a t g	t t g a a a g t g a	a a a c c t g a c g	a g a			
c a c t t t t g g g a	g g c c g a a g g g	g g a a g a t t g c	t t g			
c a a c a t a g a g	a g a c c c c a t c	t c t a t t a a a a	a a a			
t g g t a g t c c t	a g c a g t t t g g	g a g g c t g a g g	t g g			
g a c c a c c c t g	g g c a a c a t a g	g g a g a g a c c t	c a t			

tactaataaa	tagctggatg	tagtggcatg	cacctgtggt	ctcagttact	tggaaggctg	2760
aggcaggagg	atcacctgag	ccaagggaggt	cga			
gcacttcagc	ctgggtgata	aagcaagatt	ctg			
gaaggaaaga	aggaaggga	ggaagaaaga	aaa			
cgagaaagaa	gaaagaaaag	gaagggaaggga	aag			
aagtgacacc	cagtcgaaag	aagaaaggga	aga			
gaaaaaagaa	aaagtgacaa	ccggctggggc	atg			
ttgggaggcc	gaggcagggtg	gattcacgagg	tca			
ggtgaaaccc	tgtctcaact	aaagatacaa	aaa			
acctgtgagt	cccagctact	aggggaggcctg	agg			
ggagggttgca	gtgagccgag	attgctgtcac	tgc			
ctccatctca	aaaaaaaaaaa	aaaaagaaaaa	gaa			
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gctccctagc	cct			
ctgccccctgc	cccagtgcac	atcttgtgtcac	tgt			
gtctttctggt	ccctgatccc	gtctgtgtggtc	att			
ccccctggtgc	agattttcatc	cttgggtttct	cag			
gggtcccccac	ctctcagAAC	aacttttgctc	cag			
tgcccattgtg	gactctgtgc	gtgccaccctc	ttt			
gcacttcttc	ctccacccttc	catcatggggc	tgt			
cgctgtctgc	tgcagtatatgg	ttgttgggggg	aaa			
cgtgtttttac	ccacccttcct	actcactagc	ttg			
tgagtccttag	tttctgttttc	taaaaattggg	tga			
gaggattaat	agtataatgt	aaaagctgggc	agc			
tcacatcagt	atttgggaaa	tattgtttaag	ctc			
agagcagttc	cagaactttc	tacagattat	ttt			
tcttcttgta	tcaccattga	tcttgatctg	tat			
ggagttttcac	tctgtttgcc	aggctggaggt	gcg			
tccaccctcct	gagaagctgg	gattacaggc	tag			
agctgggtctc	gaactcctga	cctcaagtga	tcc			

gattacaggt	giaagtcact	gcgcccagct	glatitttat	ittttgagac	agggtctcac	4500
t c t g t c a c c c	a g g c c g g a t t	a c a g t g g c a c	a a c			
c a g g c t c a a g	c g a t c c t c c c	a t c t c a g t c t	c c c			
a c c a c a c c t g	g c t a a a t t t t	g t a t t t t t t g	t a g			
c t g c t c t c a a	a c t t g g t g t c	a a g t a a t c c a	c c a			
a c a g g c g t g a	g c c a c t g c g c	c t g g c c t t g a	t c t			
a a t a t t t t t t	t c t t c t g a a t	t a t c a g g c a t	t t a			
t t g t t t c c g c	c c a t a a g a a a	a t g g g g a a a a	t g a			
c t a a a t g a g a	t c g t g t a t g t	g a a a g t g a t c	t g c			
a g g t a g t t t t	t t a t t t t c c t	g c c a a a g g a t	a g c			
g t c t c t t g g c	t t g a c a c c c t	t c a g a g g a a t	t c c			
g c c t a g t t a g	t t t c t t c t g g	g t g c c g a g t t	a a t			
t g g a a g g a g t	g t c t t g g g g c	c a g g g t g c a g	t g g			
a c t t c g t g t g	t g g t c a g a t t	t a t g t t c c a t	g c g			
g t g t a g g t g g	a c a t g g a t g a	t g a g g t g t g t	g t g			
c g t a t g a c a a	g c a g g c t g t g	t g t g t a g g a c	c a g			
g c t a t g g a c t	g a c g a g c t t g	t t t g t t g a a c	a c t			
t c t g a a c a c t	c c g a g a t g a g	c g a g a g c g c c	a g c			
c a t g t g c t c t	t c t t g c t c c t	t g g c g t t g g g	c g t			
g g g g t g g t g t	c c a a g c t g a a	g g g g t a g t c a	a a g			
a g a t t c c c c a	g g g c a c c a g t	g a g a g a a g a a	a a c			
a a g a a a a g t g	g a a a a g c c t t	t t t t g g g g g a	a a a			
a t a a t g t a g t	t a t c a t g g g a	a a a t t a g a c t	t g t			
c t g a a g c a g a	a c a t g c a t a a	t g t t c a t a a a	t a t			
t t t t t t t t t t	g a a a t a g a g t	c t t a c t g t g t	t g c			
g g c t c g c t g c	a a c c t c g g c t	t c c t g g g t t c	a a g			
a g c t g g g a t t	a c a g g c g c c c	a c c a c c a t g c	c c a			
a g g g g g t t t c	a c c a t g t t g g	c c a g g a t g g t	c t c			
c t t g g c c t c c	c a a a g t g c t g	g g a t t a c a g g	c g t			

tttatacaca	cccaigcaaa	cagcatccag	atagagacaa	agagccttcc	cgtacccta	6240
a a a g t t t c c c	a g a a a t t g t t	c c c a g t t a g c	a t a			
c a t c a t a t a a	c a t t c a a a a a	g g t a t g t a g a	g a a			
c a g c c a c c c a	g t t t c c c t c c	c t a g g g g a a g	c c a			
g t t g a g c t g c	t t t t c c t c g t	t t t g g t t t g g	c g g			
g t a g g c a g c a	t c a t a t a c c t	t a g t g t t t a g	g g c			
t c a g c c a t g g	t g a g g a c c t t	g t c c c c c a g c	c c c			
c t g g g g c a g g	g c a g a g g c c t	a g g g a c a a g a	a t t			
t c a g g g t c a t	g t t g t c c a t c	c c t c t g c c a c	a g t			
a g a g g a g g g c	a c c c t t c t c t	c t t g c a a g c a	t t g			
t c c c a t g g c a	g c c c c t t t g g	a c a a g g a g g c	t c t			
g c t g g t g t a t	a g g a g t t c a a	a g c a c t g g c t	t t g			
g g c a c t g c a g	c t g a c t c a c t	g a t g g a c t c a	g g c			
t t c c t t g t c t	g t a a a a t g a t	a a a g a t a g c c	c c t			
a t c a g a c a a g	g c a t g t g a a c	g c c a t t a t a g	c a c			
c g a t g a c a g t	t g t c a c c g c c	a t c a t t g t t a	t t a			
g c a g c t g g t g	g a g g a g g g a g	a g a t g c c g t g	g g a			
t a t c t g g g c c	t g g a g t g t g c	a a g g c a c a c a	t g t			
g t g c a a t g c c	a t g c t c c t g a	g c c t t t g a t t	g c a			
a c c c c c a g t g	c c a c c c t g c t	c t g c t t c t c t	t c c			
a a g t g a g t t c	c c c c a a g g g g	t c g g c c g c g c	c t c			
c a g g c c a g t g	g a g t g g c a g c	c c c a g a a c t g	g g a			
a c t g g g a g c t	g c a t c t g a g g	c t t a g t c c c t	g a g			
c t c c t c a t t c	c c t g c g c c c c	c t t c c t c t c c	g g a			
t g c c a c c c a c	g g t a g a c a g g	a g g c a a g g g t	g c c			
c c c t g c c t g g	g c c g c c c a g g	t g g t t t c a c c	g a g			
t g c t c a a g g g	c c g a g g t g t c	c a c g g t a g c t	t c c			
g t g a c t t c t c	g c t c t c c g t c	a g g t a g g t g g	g c c			
t c t c t t g t g c	c a t c c a g g c c	c t g a a c c a c t	c a t			


```

ccccgtctgt tcccttgccc ccaacccccca cactccccat cctgtctgt gccacccat 7980
g c c c a t g t g t   g c c c c c a c c c   a g g a c c t c a g   c c g
c a c c g a c t g g   c c t c a c c g c c   t g g t g c c c t g   c a g
g a t c c a g a a c   t c a g g g g a t t   t c t a t g a c c t   g t a
a g a g c t g g t g   g a g t a c t a c a   c t c a g c a g c a   g g g
c a t c c a c c t c   a a g t a c c c g c   t g a a c t g c t c   c g a
c a c c c c c g c c   a t t c c c a a g c   a g g g a t g a g c   c g g
g g g a g a c t g g   c a g c c g g c g c   t g c c t a c c c t   c c a
g c t c t c a a t g   t c c c t c c t c c   c t g c t g t c c t   g g g
a c c c t t t c c a   c c t a a c c c c g   a g g a a g c c a c   a g a
c t g g c c g c t g   c a a c c c a g g t   c c c a c t g g a g   a c a
t c g t g c a g g c   c a g c t c t g t t   g t t a g a a a g c   t c t
c t c c g t c t g c   c c c t c a c c c c   a g c a c a t g t t   a g g
g a t g g g g a t g   a a t g c t t g c c   a a g a c a c t t g   a t g
g g t c t g t c c t   g t g g g g t c a a   a t a g g t c t c c   g g c
g t g a a g t g t t   c a c c t g t g t a   a a g t g t c t c a   c g c
g c a t t t c c t t   c c t g t g g c c t   c c c c g a c t c c   t c c
g g c t g g g g g c   t c t g a a t g c t   c c t c a t g a c a   c c a
t g c c a g a t c c   c c t t a g a g t a   a a g g g c a g c g   g a a
c c t g g g c c a a   g c c g a c t t g c   c c t t g c c g t g   g a t
a t g a t c g g g a   a c c t t g c t c c   t g c c a g c t t g   c a g
g c a t c a a t a t   t t t t g g t c a a   g g c a c t g a t t   g a a
a g c c c t g t g g   c c c a c c t g g g   a g g c c t c c t t   t c c
t c t c t c t g t g   a g c c t c a c a t   g g c t g g c t c c   g t g
c c g c a a c a c t   c a g g g g g c t t   t t g g c a c c g a   g a c
c c t t g c c t c c   a g c c a g g a g a   g g a g g a c g g g   c t g
g c a g g g c c c c   a g g a g g c c c c   t g c a g a g g a g   g c t
a g a g a g a g a a   g g a a g g g a g g   g c a g t g c c g g   g g c
t g g a g g c c c t   t t t g g g t g a c   c c g t c c c a g g   a g c

```

gtgagaggct ctcttccca ggttctgtg tctctctgc ctgtctgtg cgcctctcc 9720

t c t g c g a g a a	t t t g c a t c t g	t c c c t c g g t g	g c t
t t g c a t g g a g	a c t t c c t c a t	c c t g g g g c c t	g a g
c c t g g g g t c c	t a g c c t g t c c	c c a g g c g g t g	g g c
t c t g g g g g t c	t c t c g g c t g g	a g t c a c c t c c	g g g
g g t c c t c c c c	t c c t t c c c c c	c a t c c c t g c g	g t t
c c t g g g c t g a	g g a a a c c t c a	c a a c c t c a c t	t c t
t t t t t t c c a t	c a c g t g g t t t	c c t g t g g g g c	t g g
g g a a a g g g g t	g t g c t t c g g g	g a a a g g g c t t	a g t
a a a t c c g t t t	g a a c c c t g g g	c t c c c c t t c a	g t g
c t a c a c c a c t	c t t t c c c c a g	t g g g g t t g t c	t t c
t c c g c c t t c c	t t g t g a c t t g	a g t c t g t g t g	t c c
c t c g g t c t g c	g t t t c t c t t t	g c c t c t g g t c	t c t
a g a t t c a t c c	t t a g c t t c t c	t c c t c c a a a t	a t t
c a g a g g t g g g	c t c t g g g t t c	g a a g c c c g g t	t a g
c t g g g a g g t c	g a g g c t g c a g	a g a g c t g t a a	c c g
g a g c t c t g g a	a g c t t g c c c t	a g a g t c a g t c	a a g
g c g t c a g t t t	c c t c a t c t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a c c t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g c t t g a	t t t c c g g c c c	c t c t c t g t g a	a t g
c t g g g t c t t a	c c t t c c c t g a	c g c t g c c t t c	t c t
g g g c a g g c a g	a g a c g c t g c t	g c a g g c c a a g	g g c
a g c c t c a g c c	a g c c t g g a g a	c t t c g t g c t t	t c t
c c a g g c t c c c	c g c t c a g g g t	c a c c c a c a t c	a a g
g g c g g g g g a g	c c t c t g c t g a	g g c t c c t g t c	t g t
c t g c c t g g g c	t t g a a t t c a a	g g c t g g g g a c	c c a
g c c t a a t t t g	g c t c c c c c c a	g g g t g g a c g c	t a c
a g c c t c a c g g	a c c t g g t g g a	g c a t t t t c a a g	a a g
t t t g t c t a c c	t g c g g c a g g t	c a g g g g t g g g	c c c

ccccccagat	gigagcttct	gggatctctg	agttgctgac	tctcgtctct	ccccacccc	11460
agccgtacta	tgccacgagg	gtgaatgcgg	ctg			
acaagaagca	ggagtcggag	gatacagcca	agg			
atggtgggga	ccggcagggc	tgggggcagct	gag			
cggacacctt	ccccctccttg	cccacctcttg	ctc			
atggatgccc	tcttttgggag	ctgatgctca	ttt			
agcaggagggt	gaagaacttg	caccagcgtc	tgg			
agaaccgcta	caagaacatt	ctccccctgtg	agc			
accgccccctg	ccccagctgc	ctccccctcat	ctc			
ggggccatctc	cccacacccc	ccacagagcc	tcc			
ccagaagtgc	ctccccacca	ccagcaggca	gggt			
actccctcac	tccctccata	cagatgatcc	ccc			
gcctcatggc	ttctgagacc	agaatggcct	gtt			
gtgagtcacct	ggctaacca	gaccatctctg	cct			
agccgagtga	tcctgcaggg	acggggacagt	aac			
aactacatca	aggtcagcag	tgtggggccac	gtg			
cctgtctgggt	gggggggacc	tagatccaga	gac			
tgcattgggtg	agggtggcag	tgggttcaggg	cct			
gggggtgcgtc	tctccacgct	tgcgtccaga	acc			
agacctacat	cgccagccag	ggttgtcttg	agg			
cgtggcaggga	gaacagccgt	gtcatctgtca	tga			
tagggcgccc	ccccctcccc	gcattccgccc	ccg			
gagcagtcag	atgccagggc	agaaaagggat	ctc			
aaactgagggg	ctagtgacaa	agtcctcgact	aca			
atccccctgggc	tcttctgagc	tccagaccca	gggt			
ctgccccacc	tgtctgcatac	caggccccctc	ctg			
agtcctgcccc	ttaccctgca	ggctccccctt	aca			
gatccccatcc	gtgacacaaa	ctggggtcaag	ttc			
tcctgggtcac	ctttggggata	aagtcgcact	cta			

tcctctgac	ccgcacgctt	ctcttgaagg	ctcaccgccc	ccagcagccc	cagctctttc	13200
aggttcccag	ccctttctttg	cacaagctca	ttt			
tatctctgcc	tggcagatgc	ctcgttttttg	aag			
gaatccagggt	cttggtttcct	ccagggacctta	gag			
tcctcagcgc	ggtgtctccc	ccgggtcacct	gtc			
acagactggg	tgttattttgt	gtctgttgaag	ctg			
gcctgcccctg	gcaacgttttg	ttgaatgaca	aac			
gcctcaccac	ctgtttgggtgg	ttgatcttgag	acg			
agcccatccg	tccatccaac	aaatgttttgg	gcc			
ggacctggga	tggggccacag	tggccctgctc	tgt			
ccagaacaaaa	tgcgtcccat	actgggcccgga	ggt			
ctctgtgacc	aaactgcggggg	agcatgacac	aac			
ctccccgctg	gacaatgtga	gtggcccccca	cgc			
ggacttgttc	tcctctcttgg	tcggggtagggt	tga			
gggggcactga	ccctatgtcc	tcgggcttaggg	gag			
agtacctgag	ctgggcccgac	catgggggtcc	cca			
tggaccagat	caaccagcgg	caggaaagtc	tgc			
gcagggtgagg	atgataatcc	tgatggtagt	agt			
tgccatgagc	tgttataagc	aataataaacg	tta			
cccccggtt	ctcctgggtc	ccctcatggc	tcc			
ccagcccccac	tttggccctc	tgcctgtggg	tat			
catctcgccc	aaccctgcca	aatacagagg	agg			
ccaagctagt	caggggcaagg	ccggggcaggc	acc			
cgctttctct	cgagggtccca	ttctgtttggt	ttc			
tgtcccccatt	tcctcctctt	tttccatcgg	tag			
ctgcccctctc	tcccagcttc	cccagggcagt	gcc			
gatgggtgat	gcttcttttg	ggctgcacat	aac			
tgatcaggag	acctctggta	agggtgcagag	gtg			
acagggtgagc	ccactgagct	ggccctggccct	ggg			

cciccgcitc ccagctgtgt ggctctggac aaattactta acttttctaa cccicagctt 14940

c c t c a t c t g t	a a a a t c a g g a	t c t c a g g g t t	g t c
g t g g c t g g a a	t t c c g t c a g c	c c t c a a a a a c	t g g
t c a g g c a g a g	a a t a g g g g a a	t g g g a a c c t g	c c t
t g g a c c c c a g	g c c t g c g a c g	g c c t c t g g c t	t c c
t g g g a c a g g g	c a a g t c g g c t	g a a t c t a g a g	g t g
c t c t g t c c t g	t g c t c t c t c a	g g g a c a g g c c	c a t
g c c a c a c a c a	c a t t c a c a c a	c t t c t t g a a a	g c c
a a g g a a g t g g	g t g t g g g g g g	t t a t t t t t g a	c a a
t c a g g g c a t c	a g c t t g c t g g	g c t c a g c t g a	g g g
t t g c c c a g g g	c t g g g a a a g g	a g a g a a a c t t	c c t
c c c t g t g c c c	c c g c a c c c t g	c t g t c t c a g g	g c t
g g a a a a g g g a	a g t g a a g c c a	t g c t g a g a g a	c g c
g a g g g c t c a g	g g t a c c t g g g	a g c c g g c a g g	a c a
t c c g g g g t g g	g g g c a g c c a c	t c a c t a g g a g	t g a
a a g g a t g g t g	g c a g c t g g g g	a g c c a g c g t c	a g c
c a t g c a g a g c	t g g g c a a a c c	t c c a t c a t c a	c t t
c c a t c a c t g g	a g g c t c a g g c	t g c t c c t g t g	g t g
c c c c c c t t c c	c g g g g a g g g c	t t g a c t g g c c	t c t
c g g c a t c g g c	c g c a c a g g c a	c c a t c a t t g t	c a t
c a a g g g t g a g	g g g c a c c t g g	g g g t t t g g g g	g t g
c t a t g c c t g g	a c c t g a g g t t	t g a c t g c c c c	c c a
c c a g a a g a c c	a t c c a g a t g g	t g c g g g c g c a	g c g
g t a c a a g t t c	a t c t a c g t g g	c c a t c g c c c a	g t t
g g t c c t g c a g	g t g c g t g c a g	a g c a g g g c c t	g g g
g t g c c a c c t g	g c c c t g c t g g	g a c c a c c a c c	t t c
a a g g g c c a g g	a g t c g g a g t a	c g g g a a c a t c	a c c
g c c a a g g c c t	c c c g c a c c t c	g t c c a a g t g a	g t g
c c c c t t t g t c	c t g c c c a g c c	c g a t c c t c a c	t t t

gggacctggc ticaagttca ggcttgggtc tcaccccttc igttcataag catttccctga 16680

gtgcccacac	gtgtggggcct	ctgctaggta	cca
ctctgtcctc	tagggagcttg	gagtcctagtg	cag
gggggtggcca	gagggggactg	ccagtgccgg	gtc
aactgcctgt	acttgcccc	ctgcacccgg	ctg
cctgcacact	aagaacaaga	gggaggagaaa	agt
gaagagcaag	ggttccctca	agagggaagtg	agc
agctcttctg	cctggggtgtc	ctcccttgccc	tgc
ctggggtggat	gggggtggccg	cagccctcatt	ctg
gttccacctc	cagggttccag	ctaccctcttc	act
agccctgacc	ctgtggaagc	atttcgcgat	gga
ccccattctt	ttgtaattta	aatggctgca	tcc
agcccagcca	ggccccaggc	agggccaacc	ctt
cactgtgtgt	cgccctctgag	cccttttgctt	gcc
caggatgggt	aactgtgtgt	gcctccgtgc	gtg
agacggacgt	gggtcgggac	tccgccctcgc	acg
ccagtcctcct	tcttttaaaat	ggaggggcgat	cat
atgacggctg	acgataagac	gggacacagtg	act
actaaaagac	tacacacgtt	agtttcagtcct	agg
gcggaaactg	agggacagaa	aaactaagta	act
atggaacagt	gaggctggga	ttcgaaccca	ggc
accctggagt	tgcagctggg	gccaccctca	ggg
gagttccaga	tctgaactaa	gaagagtagtg	taa
cccggctgcg	tccctcttgg	cgggaacagg	gac
cagctccctcc	cctcatccag	gccgctgctg	ccc
ctggctgacg	tgaagagtgc	tttggtttttt	gtc
gggggtttctt	ctttatttga	aacactgggtg	tcc
cctcaggaag	tgctggcgcc	cactcctgga	aag
agaggctggg	cgtgcat tac	tcagcaaatac	ctt

acagtcctcc gacctcctgg aacttaggag gctggtcagg gaga

18404

<210> 2

<211> 18404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> genomic DNA

<400> 2

tctccctgac	cagccctccta	agttccaggga	ggt
ggggggctctg	taaggattttg	ctgagtaatg	cac
gctgtctcag	cctttccagg	agtggggcgcc	agc
tttactcccc	aggacaccag	tgttttcaaat	aaa
aaggaagagg	ggacaaaaaaaa	caaagcactc	ttc
caagaggata	aggggcagcag	cggccctggat	gag
ctgaggagcc	tgtccctgtt	cccgccagag	ggg
gcttccggct	gttaactact	cttccttagtt	cag
gatacagggcc	ccccctgaggg	tggcccccagc	tgc
gggggtcagac	agcctggggtt	cgaatcccag	cct
gcaagtgacc	aagttactta	gttttttctgt	ccc
tgacagaagt	gcctagactg	aactaacgtg	tgt
agcgtgtgat	gagtcactgt	gcccgtcttta	tcg
accaccctgt	tatgatcgcc	ctccattttta	aag
tcaccctccc	acgtgcgagg	cggagtcccg	acc
ttcacgcgag	gcacgcacgg	aggcacacac	agt
cccactcact	gggcaagcaa	aggggctcaga	ggc

tacaagagga	gaagggttgg	ccctgcctgg	ggcctggctg	ggctatatac	agggicaggg	1080
agagggtgggg	gggattgcagc	cattttaaat	tt	aca		
ttgtgagtc	gtccatcgcg	aaatgcttcc		aca		
gggagtgagg	gagtgagagg	gtagctggaa		cct		
gctgggaagc	acagaatgag	gctgcggcca		ccc		
aaggacacag	ggcaggggcag	ggaggacacc		cag		
aggacagcac	cgctcacttc	ctcttgaggg		aac		
gctgcttctt	cactttctcc	tccctcttgt		tct		
ccttggtgtct	gcagccgggt	gcagggggggc		aag		
cagcacaggg	ggacccggca	ctgggcagtc		cct		
agccacgggtc	cctgcactag	actccaagct		cct		
gagtgcgctg	ctggtaacct	gcagaggccc		aca		
aacagaaggg	gtgagaacca	agcctgaact		tga		
gtcctctcca	gaaagtgagg	atcggggctgg		gca		
gcagtcaggg	ccactcactt	ggacgagggtg		cgg		
gctgggggat	aggtgatgtt	cccgtactcc		gac		
agggacagtg	ggaagggtggt	ggtcccagca		ggg		
cccccccccc	ccccaggccc	tgctctgcac		gca		
tggtttcaat	gaactggggcg	atggccacgt		aga		
ccatgcccga	gcgctgcgcc	cgcaccatct		gga		
ccaggcctgg	gtgggggggca	gtcaaacctc		agg		
tgctcacc	ccccccca	acccccagggt		gcc		
tgagcatgtc	gatgacaatg	atgggtgcctg		tgc		
gggggtgccat	cagaggccag	tcaagccctc		ccc		
ccagccccag	gcaccacagg	agcagcctga		gcc		
ggtcaccggg	caagtgatga	tggagggtttg		ccc		
ggctctgcgg	tgctgacgct	ggctccccag		ctg		
gcgccgactc	ctcactccta	gtgagtggt		gcc		
aatcccacca	ctgtcctgcc	ggctcccagg		tac		

ggagttaagg agcgtctctc agcatggcct cacttccctt ttctttcaaa ccttgacgtc 2820

agggaaggga	tagccctgag	acagcagggt	gcg
agcagtgcag	taggaagttt	ctctctctttc	cca
ccccaggccc	acctcagct	gagccccagca	agc
tcaaaaccag	attgtcaaaa	ataaccccccc	aca
aaaggccatg	gggcctttcaa	gaagtgtgtgtg	aat
agctctcggg	gatgggcctg	tccctgagag	agc
cccatcgggg	gcacctctag	attcagccga	ctt
gggggaagagg	aggaagccag	aggccgtcgc	agg
ggaccgggggc	aaggcagggtt	cccatctcccc	tat
agtaacagcg	cccagtttttt	gaggggctgac	gga
tgagttctca	cgacaaccct	gagatcctga	ttt
aagttaagta	atttgtccaa	gaccacacag	ctg
cctctcatcc	accagggcca	ggccagctca	gtg
cttgcagccc	ccacctctgc	accttaccag	agg
tagacagagg	agttatgtgc	agccccc aaag	aag
ggccagggatg	gggcactgcc	tgggggaagct	ggg
aagccctgcg	gctaccgatg	gaaaaagagg	agg
tcctggggaga	agaaaaccaac	agaatggggac	ctc
ggcctactgt	gggtgcctgc	ccgggccttgc	cct
ggtcccggggc	tcctcctctg	tattttggcag	ggt
ctctgaggaa	gatacccaca	ggcagaggggc	caa
cccagggttc	tggagccatg	agggggaccca	gga
aatgtgcgag	ctaacgttta	tattgcttat	aac
tctcagctgt	cactactacc	atcaggattta	tca
ccctgcgtga	ggcagacttt	cctgcccgtg	gtt
cccaggctca	ctgggggaccc	catgggtcggg	cca
ccgaatcagg	tctccctaag	ccgagggacat	agg
cctcatccat	ctcaccctac	ccgaccagag	agg

```

aatggggcag ggcgtggggg ccaticacat tgtccagcgg ggagacctgt aaggtaacgga 4560
g t t t g t a t t c   g g t t g t g t c a   t g c t c c c c g c   a g t
g c t g c a t g c c   c a c c t c g g g c   c a g t a t g g g a   c g c
g g g g a t g a g g   c a c a g a g c a g   g g c a c t g t g g   c c c
t g c c t g g c a c   c g g c c c a a a c   a t t t g t t g g a   t g g
a c c t g g g c t c   t c g t c t c a g a   t c a a c c a c c a   a c a
c c g g t a c a t c   c g t t t g t c a t   t c a a c a a a c g   t t g
t g c a a a c c a c   a c a g c t t c a c   a g a c a c a a a t   a a c
g a g c t c a c a g   a g a c a g g t g a   c c g g g g g a g a   c a c
c g t a a t t c t c   c c t c t a g g t c   c t g g a g g a a a   c a a
t c c g g c t g t g   t c t t c a a a a a   c g a g g c a t c t   g c c
t t c c t a g c a g   a a a a t g a g c t   t g t g c a a a g a   a a g
c t g g g g g c g g   t g a g c c t t c a   a g a g a a g c g t   g c g
a t g c c a g g c c   t t a g a g t g c g   a c t t t a t c c c   a a a
c a g a a a g g a a   g g a a c t t g a c   c c a g t t t g t g   t c a
a g a g g g t g c t   g t g t a g g g g g   a g c c t g c a g g   g t a
g g c a g g g a g g   a c a g g a g g g g   c c t g g a t g c a   g a c
g a c a g c c t g g   a a c c t g g g t c   t g g a g c t c a g   a a g
g g g t c a c g t t   g t g t a g t c g a   g a c t t t g t c a   c t a
c c c t c a c c c c   t g a g a t c c c t   t t c t g c c c t g   g c a
g a c c a c a a g c   a c g g g g g c g g   a t g c g g g g a a   g g g
c t c t c g g g t g   g t c a t g a c g a   t g a c a c g g c t   g t t
a t t g a c c g t g   g c c t c c a g a c   a a c c c t g g c t   g g c
g c c t a g c a g c   t g g t t c t g g a   c g c a a g c g t g   g a g
t g g c c c a g c a   c a g g c c c t g a   a c c a c t g c c a   c c c
t t t g c c c a g c   t g t c t c t g g a   t c t a g g g t c c   c c c
g c c t c t c c t c   c c a c g t g g c c   c a c a c t g c t g   a c c
g a c c c g g g g a   t g t t a c t g t c   c c g t c c c t g c   a g g
g g g c g g a g a g   g a g g c g a g a t   g g t c t g g g t t   a g c

```

ccctcctgagc taacaggcca ttctgggtctc agaagccaatg aggcttgcgg gggactgtgg 6300

gcagcagggg	tgggggga tca	tctgtatgga	ggg
agcaggggggc	aacctgcctg	ctgggtgggtgg	gga
ttggagagaagg	gggagggtctt	gtggggggggtg	tgg
tggagacctg	tgagatgagg	ggagggcagct	ggg
gcagccctggg	tgctcacagg	ggagaaatgtt	ctt
ccgctgcccct	tccagacgct	ggtgcaagtt	ctt
tgtgggtggg	gaaatgagca	tcagctccca	aag
gggtgggttca	ggagcagagg	tgggcaaggga	ggg
gctgccacca	ccctcagctgc	cccagcccctg	ccg
ccagaaggcca	gccttggctg	tatccctcgga	ctc
gttctcaatg	tcagccgcct	tcacccctcgt	ggc
agaagtcagc	aactcagaga	tcccagaagc	tca
gggagggcagc	tggggcccacc	cctgacctgc	cgc
tcaatccccg	tcttcttgaa	atgctccacc	agg
ccacccactg	tgtagcgtcc	acccctggggg	gag
gtctccctcc	ctgggtcccc	agcccttgaat	tca
acactgtggt	cacagacagg	agccctcagca	gag
tcgcacatga	cccttgatgtg	ggtgacctg	agc
tcactgagca	cagaaagcac	gaagtctcca	ggc
gtccaggggct	cggcccttggc	ctgcagcagc	gtc
tgggtaccacc	tagagaaggc	agcgtcagg	aag
ctgagcagag	acattcacag	agagggggccg	gaa
tgcgctacat	gcttccaaat	ccaccacctc	att
taggtatgat	attaccccca	ttttatagat	gag
ggcctaggggc	cccttgactga	ctctaggggca	agc
gtgcagtggc	gcgggttacag	ctctctgcag	cct
cctccagagt	tctaaccggg	cttcgaacc	aga
gcaatat tca	aaatat tgg	aggagagaaag	cta

tgigccccag cagagaccag aggcaaagag aaacgcagac cgaggccaca ccacagggag 8040

t g g t g g g a g a	t g g a c a c a c a	g a c t c a a g t c	a c a
a g g g a g g c g g	g g a a g a c a a c	c c c a c t g g g g	a a a
c t g g a t g a t g	t c a c t g a a g g	g g a g c c c a g g	g t t
c a g a a a g c a g	a a c t a a g c c c	t t t c c c c g a a	g c a
c c c c a c a a a g	c c c a g c c c c a	c a g g a a a c c a	c g t
g g g a g a g a g t	g a g a a g t g a g	g t t g t g a g g t	t t c
g c a a a t t t t c	c a a c c g c a g g	g a t g g g g g g a	a g g
t c t c a c c c c t	g c c c g g a g g t	g a c t c c a g c c	g a g
g g g c t a c t t c	a g c c c a c c g c	c t g g g g a c a g	g c t
g a g c c c c t t c	c c t c a g g c c c	c a g g a t g a g g	a a g
a g g a a g c g c a	g a g c c a c c g a	g g g a c a g a t g	c a a
c a a g g c a g a g	g a c a c a g c a g	a a c c t g g g a g	a a a
g g g t g a c a c t	g g c t c c t g g g	a c g g g t c a c c	c a a
c t t a a c c t c c	c g c c c c g g c a	c t g c c c t c c c	t t c
a c c c a g g c c t	c a g c c t c c t c	t g c a g g g g c c	t c c
c a g g c a c t g g	t c a g c c c g t c	c t c c t c t c c t	g g c
a g c t t t a g a g	g g t c t c g g t g	c c a a a a g c c c	c c t
c a g g g g g c a g	a c a c g g a g c c	a g c c a t g t g a	g g c
a g g c c g a t c c	a g g a a a g g a g	g c c t c c c a g g	t g g
c a g c t c t a a g	t t t c a a t c a g	t g c c t t g a c c	a a a
t c t c a g a g a g	g c t g c a a g c t	g g c a g g a g c a	a g g
t g a a t g c a g g	g a t c c a c g g c	a a g g g c a a g t	c g g
c c c t a g c g t t	a t t c c g c t g c	c c t t t a c t c t	a a g
g a a a g g a g c c	a t g g t g t c a t	g a g g a g c a t t	c a g
g g g a g a c c a c	a g g a g g a g t c	g g g g a g g c c a	c a g
t g c c c g g g a c	a g c g t g a g a c	a c t t t a c a c a	g g t
t c t c t g t t t g	g g c c g g a g a c	c t a t t t g a c c	c c a
c t g g g a c a a g	g c a t c a a g t g	t c t t g g c a a g	c a t

ctcctcactg tcctaacatg tgctggggtg aggggcagac ggaggaaggc aggcctcgatt 9780

ccagaggaag	aagagctttc	taacaaacaga	gct
agtggcctcc	ctgtctccag	tgggacctgg	gtt
cgaggcagct	ttctgtggct	tcctcgggggt	tag
agacaccagg	tcccaggaca	gcaggggagga	ggg
agggggagggg	atggagggtta	ggcagcgcccg	gct
cagggtggga	gccggctcat	ccctgcttgg	gaa
cactagtggg	atcggagcag	ttcagcgggt	act
cctgcaggac	accctgctgc	tgagtgtagt	act
tctccccctcc	atacagggtca	tagaaaatccc	ctg
gatccccccac	cctgcaggggc	accagggcgggt	gag
aggggcaggga	tcggctgagg	tcctggggtgg	ggg
agggatgggg	agtgtggggg	ttggggggcaa	ggg
gggaaccagg	aatgagtgggt	tcaggggcctg	gat
gggttgcggg	ggggcccacct	acctgacgga	gag
ggggccgagcc	aggaagctac	cgtgggacacc	tcg
cccactgagg	tctcgggtgaa	accacctgggg	cgg
cgtggggcacc	aggcacccctt	gcctcctgttc	tac
tcctggggggc	ttccggagag	gaaggggggcg	cag
caggcagaga	gctcagggac	taagcctcag	atg
acccccgggtg	gtcccagttc	tgggggctgcc	act
ggggacaggga	agaggcgcg	ccgacccccctt	ggg
agcacagcaa	gggaagagaa	gcagagcagg	gtg
tcccacacgt	ctgcaatcaa	aggctcaggga	gca
gcagtaaggga	cacatgtgtg	ccttgcacac	tcc
aaccacagacg	gtcccacggc	atctctccct	cct
ctggcccacg	ctaataacaa	tgatggcgggt	gac
tgccggggcgc	tgtgctataa	tggcggttcac	atg
ccctatgaaa	cagggggctat	ctttatcatt	tta

ttaaaggcat	igccigagtc	catcagtgag	tcagctgcag	igccaggatt	caaaccaga	11520
cagtc c g g t t	c c a a a g c c a g	t g c t t t g a a c	t c c			
aacagagatt	aagagcctcc	ttgtccaaag	ggg			
taagaccttg	ccaatgcttg	caagagagaaa	ggg			
ttgtccatgc	cactgtggca	gaggggatgga	caa			
gggtccctttc	taattctttgt	ccctaggcct	ctg			
cctatctcct	ggggggctggg	ggacaagggtc	ctc			
tgatcttaga	ggccctaaac	actaagggtat	atg			
aaacatcaac	accgccaaac	caaaaacgagg	aaa			
acacatatatg	gtggccttccc	ctaggggagg	aaa			
gagacacttg	gttctctaca	taccttttttg	aat			
ataaaaaataa	atatgctaac	tgggaacaat	ttc			
ctcttttgtct	ctatctggat	gctgttttgca	tgg			
cgcagtggtct	cacgcctgta	atcccagcac	ttt			
gtcaggagat	cgagaccatc	ctggccaaca	tgg			
aaaaaatatag	ctggggcatgg	tgggtgggcgc	ctg			
caggagaatc	acttgaacc	aggaagccga	ggt			
actccagcct	ggcaacacag	taagactcta	ttt			
ttgtgtgctt	aatattttatg	aacatttatgc	atg			
tttttaagccc	aacaagtcta	atttttcccat	gat			
aaacatcaat	gtttttcccc	aaaaaaaggct	ttt			
atttggtttct	ggtttttcttc	tctcactggt	gcc			
gcatggtcca	gcttttgacta	cccccttcagc	ttg			
gcggaacccc	cacgcccac	gccaaaggagc	aag			
gcgggacacc	cgctggcgcct	ctcgctcatc	tcg			
ggcactgagc	aagtgttcaa	caaacacaagct	cgt			
agtacagctt	cctgggtccta	cacacacagc	ctg			
cacagtcaca	gcacacacac	ctcatcatcc	atg			
gcacatcccc	acgcatggaa	cataaatctg	acc			

gcaccaaacg	cccacigcac	ccigggcccca	agacactcct	iccagggctt	aaacccactt	13260
ggtgggaagg	aatttaactcg	gcacccagaa	gaa			
tgggaagaggc	aggaatttcct	ctgaaggggtg	tca			
gtacagcttc	tgctatcctt	tggcaggga	ata			
gtgtgggggtt	tgcagatcac	tttcacatac	acg			
tgatgtagga	atcatttttcc	ccatttttctt	atg			
aattacaaga	gtaaatgcct	gataatttcag	aag			
gataaaaagta	gagatcaagg	ccaggcgccag	tgg			
ggggggtgagg	ctgggtggatt	acttgacacc	aag			
aaacccctgtc	tctacaaaaa	atacaaaaatt	tag			
cccagggtact	tggggagactg	agatggggagg	atc			
agtgagccat	ggttgtgccca	ctgtaatccg	gcc			
aaaaataaaa	atacagctgg	gcgcagtgac	tta			
ccgagggtggg	aggatcactt	gagggtcagga	gtt			
ccccatctct	actagcctgt	aatcccagct	tct			
gatcatgccca	ccgcactcca	gcctggggcaa	cag			
aattaaaaaac	catacagatc	aagatcaatg	gtg			
gcaaaccaagg	caaaaataatc	tgtagaaagt	tct			
gcctgacaaa	tgagcttaac	aatattttccc	aaa			
aggggttttcag	tgctgccagc	ttttacattta	tac			
gtagggtgtta	ttcacccaat	tttagaaaca	gaa			
gccaagggtc	acaagctagt	gagtaggaag	gtg			
gcctgggtgcc	ctttcccca	acaaccatac	tgc			
tgggcaactgc	cacagcccat	gatggaagggt	gga			
tgggtcagggg	caaagagggtg	gcacgcacag	agt			
aagccatgtg	gctggagcaa	agttgtttctg	aga			
tcaaggccag	gctgagaaac	caaggatgaa	atc			
cctggcaggga	aaatgaccac	agacggggatc	agg			
cgggtgggggcc	gacagtgaca	agatgtgcac	tgg			

caagaatcag	cagggctagg	gagccaccca	cccacaaact	cgccagtact	ctgtaagcag	15000
g t t g t c a c t t	t t t c t t t t c t	t t t t t t t t t t	t t t			
c a g g c t g g a g	t g c a g t g a c g	c a a t c t c g g c	t c a			
c a a t t c t c c t	g c c t c a g c c t	c c c t a g t a g c	t g g			
g c c t a a t t t t	t t t t t t g t a t	c t t t a g t t g a	g a c			
t c t t g a a c t c	c t g a c c t c g t	g a t c c a c c t g	c c t			
g c t t g a g c c a	c c a t g c c c a g	c c g g t t g t c a	c t t			
c t t t t t c t t t	t t c t t t c c t t	t c t t c t t t c g	a c t			
t t c t t t t c t t	t c t t t c c t t c	c t t c c t t t t c	t t t			
c t t c t t t c t c	t t t t t c t t t c	t t c c t t c c c t	t c c			
t t t t t t t g a c	a c a g a a t c t t	g c t t t a t c a c	c c a			
t c a c t g c a g c	g t c g a c c t c c	t t g g c t c a g g	t g a			
t g a g a c c a c a	g g t g c a t g c c	a c t a c a t c c a	g c t			
t c g t a g t a g a	g a t g a g g t c t	c t c c c t a t g t	t g c			
a a g t g a t c c t	c c c a c c t c a g	c c t c c c a a a c	t g c			
t a c c c a g t a t	t t t t t t t t a a	t a g a g a t g g g	g t c			
a c t c c t g a g c	t c a a g c a a t c	t t c c c c c t t c	g g c			
g c g c c a c c t c	a t c t c g t c a g	g t t t t c a c t t	t c a			
t g c t g t g g c c	c t g c c t c c g c	t c c a c t a g g g	t c c			
t g t t t g t t c c	c a c a t t a g g g	c t t t g t g c t c	a c c			
c t t g a t c a c t	a c g t c a c a t g	g c c a g c t c c t	c t t			
g t c a c c t c c t	c g g g a a g g c c	t c c c t g a t c c	c t c			
g t c a c t t g c t	a g c a t a t g a a	g c t g g t t c a t	t t t			
g t c t c a c t c t	g t c g c c c a g g	c t g g t g t g c a	g t g			
a c c t c c c a g g	c t c a a g c a a g	c c t c t c a c c t	t a g			
t g t g c c a c c a	c a c c c a g c t a	a t t t c t t a t t	t t t			
c c a g g c t g g t	c t c a a a c t c c	t g g g c t c a a g	c a a			
t g g g a t c a c a	g g t g t g a a c c	a c t a c a c c c g	g c c			
t c t g a g a a t c	t g c a a t g a t c	c a a t t t a t t g	g g t			

ggaatgtaag ciccgtgaga gcagagacca tgtctgtctt gttcactcca gtattaccag 16740

c a t c t t a a a c	a g c a c c t g g t	g c a t a a t a g a	t g c
g c a g g g g a a a	g g g a a g t g a a	a g g a a a c a a a	g a a
g t g c g g a g a a	g t t g g c t g g a	c g t g g g a g g g	c c t
t g a g g t g t t g	t g a g c t a c c c	a g g g g g a c a g	g t c
a g a g g c t g g a	a g t a g a a a t g	c a a t g g a g a g	a a c
t t a a a g a g g g	g g c a g a g g a g	c a t g a g t g a g	c c g
a a g t t c a t a g	g g a c c g g a a a	c a g g c g c a g g	g c a
c g t c g g a g t g	a g c a t c a a c a	a a g c c c t c c c	t c c
c c g a t g g t g c	c c g g g a c t t a	c c c a c g g g a c	a g c
g g c g g a g g g c	c g c a g g g g g c	g g g g c t g a g c	c a g
c c a g g t g a g g	a a g a a c c g c t	c a g t a a t c a g	c c a
c a a t g g c a c t	g c a g g g a c a a	a c c c t g g a c t	a a t
g g g g c t g g c c	c g a g a c c g c c	c a c a g c g g c c	a g c
a g c a g g c c c g	c c t g c t g g t c	c a g g g c c g c c	t t c
c t c c a c c t g g	a g c t c a a g c t	g a c a g a g c g g	c g g
a g t a a c c c t g	g c t g a g g a a g	a g c a a c c a a t	g g g
a g g g c c t a a g	g a a a a t c c c t	a a c a g c c c a g	t t c
g g c c c a c c c a	c c c a g g g c g c	t g a g g g a c c c	a c t
g g g g a g g a g c	c t c a g g t a g g	g t t a g g c c c t	g g g
g g g a g g a g c t	g t t c a g g g g g	a t g g g g c c t g	g a a
t g g g g g t t g t	c a g g t c c g c a	a g a g a c t g a c	a c c
t t g t c t g g a a	c a t c a a g g c c	t t t c c t c c c c	t g g
a g g a g g c g g c	c a c g c t g c c a	c c a g c a g c a g	g c c
g a a a c a g c g c	c t t c a g c t t g	c c t g a c a g g c	t g g
a c t t g a c c a a	g c g a g c a a a c	t t a a g g a c a c	c t g
t c c t a a g g a c	c a g c g t g c c t	a a g a c a c c t g	g a g
c c c c c a c t g g	c t g g g c a g c t	g t t t g c c a a a	c a g
g t t t g g a t g a	t g a c a t t t g g	t c t a c a c t g g	g c a

<210> 3

<211> 1794

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> complementary DNA

<400> 3

```
atgctgtccc gtgggtggtt tcaccgagac ctc
aagggccgag gtgtccacgg tagcttcctg gct
ttctcgcctc ccgtcagggt ggggggatcag gtg
gatttctatg acctgtatgg agggggagaag ttt
tacactcagc agcagggtgt cctgcaggac cgc
ccgctgaact gctccgatacc cactagtgag agg
caggcagaga cgctgctgca ggccaagggc gag
ctcagccagc ctggagactt cgtgctttct gtg
ggctccccgc tcagggtcac ccacatcaag gtc
ggtggtttgg agaccttcga cagcctcacg gac
attgaggagg cctcaggcgc ctttggtctac ctg
aatgcggctg acattgagaa ccgagtggtg gaa
acagccaagg ctggccttcg ggaggagttt gag
ttgcaccagc gtcctggaagg gcagcggcca gag
attctcccct ttgaccacag ccgagtgatc ctg
tccgactaca tcaatgccaa ctacatcaag aac
aagacctaca tcgccagcca gggctgtctg gag
gcgtggcagg agaacagccg tgtcatcgtc atg
aacaatgcg tccatactg gccgaggig ggcatgcagc gtgcttatgg gccctactct 1140
gtgaccaact gcgggggagca tgacacaaacc gaa
```

```

c c g c t g g a c a   a t g g a g a c c t   g a t t c g g g a g   a t c
g a c c a t g g g g   t c c c c a g t g a   g c c t g g g g g t   g t c
c g g c a g g a a a   g t c t g c c t c a   c g c a g g g c c c   a t c
c g c a c a g g c a   c c a t c a t t g t   c a t c g a c a t g   c t c
g a c t g t g a c a   t t g a c a t c c a   g a a g a c c a t c   c a g
g t g c a g a c g g   a g g c g c a g t a   c a a g t t c a t c   t a c
a c t a a g a a g a   a g c t g g a g g t   c c t g c a g t c g   c a g
a t c a c c t a t c   c c c c a g c c a t   g a a g a a t g c c   c a t
c a c a a g g a g g   a t g t g t a t g a   g a a c c t g c a c   a c t
a a g c a g c g g t   c a g c a g a c a a   g g a g a a g a g c   a a g

```

<210> 4

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser
  1                               5

```

```

Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser
                20                      25

```

```

Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser
          35                      40

```

Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly
50 55

Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu
65 70

Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp
85

Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr
100 105

His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr
115 120

Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser
130 135

Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro
145 150

Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met
165

Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser
180 185

Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala
195 200

Arg Gln Pro Tyr Tyr Ala Thr Arg Val Asn Ala Ala Asp Ile Glu Asn
210 215

Arg Val Leu Glu Leu Asn Lys Lys Gln
225 230

Ala Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser
245

Asn Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln
260 265

Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe
275 280

Gln Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly
290 295

Tyr Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro
305 310

Ile Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala
325

Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val
340 345

Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val
355 360 365

Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser
	370					375		

Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr
385					390			

Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp
				405				

Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro
			420					425

Leu	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu
		435					440	

Ile	Ile	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Ile
	450					455		

Val	Ile	Asp	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile
465					470			

Asp	Ile	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln
				485				

Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr
			500					505

Ala Gln Phe Ile Glu Thr Thr Lys Lys Lys Leu Glu Val Leu Gln Ser
515 520

Gln Lys Gly Gln Glu Ser Glu Tyr Gly
530 535

Met Lys Asn Ala His Ala Lys Ala Ser
545 550

Glu Asp Val Tyr Glu Asn Leu His Thr
565

Val Lys Lys Gln Arg Ser Ala Asp Lys
580 585

Lys Arg Lys
595

<210> 5

<211> 18404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> bisulfited genomic DNA

<400> 5

ttatttagtt gtgttagtg tagattaat gtt

ttgtatgcgt ttigtitggg aaatagttgt ttagttagt ggggagtagt ttatgttttag 120

a t t a t t a t t t	t t t t t a g g t g	t t t t a g g t a c	g t t
a t t t t t t t t t	g t a g g t g t t t	t t a a g t t t g t	t c g
t t t t g a g a t c	g t t a g t t t g t	t a g g t a a g t t	g a a
g t t a t t t t a t	g g g t t t g t t g	t t g g t g g t a g	c g t
t t g t g t t a t t	g t t a g g g g a g	g a a a g g t t t t	g a t
g a t t t a g t t t	t g g t g t t a g t	t t t t t g c g g a	t t t
t t t t t t t g t t	t t t t t a g g t t	t t a t t t t t t t	g a a
t t t a a t t t t g	t t t t a g g g t t	t a a t t t t a t t	t g a
t g a g a g g t t g	g a g t g g g t t t	t t t a g c g t t t	t g g
t t t t t t t t g a	g g a a t t g g g t	t g t t a g g g a t	t t t
g a g a g g t t t t	t t t t a t t g g t	t g t t t t t t t t	t a g
t a t t t a a t a t	t t c g t c g t t t	t g t t a g t t t g	a g t
t t t t t t c g g g	g g a a g g c g g t	t t t g g a t t a g	t a g
g t t g t a g g g a	a g t t g g t c g t	t g t g g g c g g t	t t c
t t t t g g a g a t	t a t t a g t t t a	g g g t t t g t t t	t t g
c g a g g a g g a a	g t g g t t g a t t	a t t g a g c g g t	t t t
t a g t t g t g t c	g t t g g t t t a g	t t t c g t t t t t	t g c
t a t a g a g a g a	t g t t g t t t c g	t g g g t a a g t t	t c g
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g t t t t g t t g a	t g t
c g a t t t g t c g	t t g t t t t g c g	t t t g t t t t c g	g t t
g t g a g g a t t t	t c g g t t t a t t	t a t g t t t t t t	t g t
a g t g t g t a t t	t g t t t t t t t t	a t t g t a t t t t	t a t
t t t t t g t t t a	g g a t t t g t t t	t t t t g g g t a g	t t t
g t t a t t c g c g	a a g g t t t t t t	t a c g t t t a g t	t a a
t t g g t t t t a t	t t t t t t t g t t	t t t t t t t a t t	t t t
g t a c g t g t t g	a g t a t t t a t t	a t g t a t t a g g	t g t
g a a t a a g a t a	g a t a t g g t t t	t t g t t t t t a c	g g a
t c g a a t a a a t	a a t t t a a t a a	a t t g g a t t a t	t g t

tagatagittt tggicgggtg tagtggittt tatttigitat ittagtattg tgggaggttg 1860

aggcgagagg	attgttttgag	tttaggagtt	tga
ttgtttttat	aaaaaaaaataag	aaatttagttg	ggt
ttatggagag	gttaagggtga	gaggttttgtt	tga
gatgattgta	ttattgtata	ttagttttggg	cga
aaaaaaaaaaa	gaaaaatgaat	tagtttttata	tgt
attattagtt	ggaggggatta	gggagggtttt	ttc
ggatgaggag	gaagaggaggt	tggtttatgtg	acg
gtagaggaga	tggtgagtatt	aaagtttttaa	tgt
ttcgtggtag	aggatttttag	tggagcggag	gta
agttaggatg	ttgaaagtga	aaattttgacg	aga
tatttttggga	ggtcgaagg	ggaagattgt	ttg
taatatagag	agattttatt	tttatttaaaa	aaa
tggtagtttt	agtagttttgg	gaggtttgagg	tgg
gattatttttg	ggtaatatag	ggagagatttt	tatt
tatttaataaa	tagtttggaatg	tagtggtatg	tatt
aggtaggagg	attattttgag	ttaaggagggt	cga
gtatttttagt	ttgggtgata	aagtaagatt	ttg
gaaggaaaga	aggaaaggga	ggaagaaaga	aaa
cgagaaagaa	gaaagaaaag	gaagggaagg	aag
aagtgatatt	tagtcgaaag	aagaaaggga	aga
gaaaaaagaa	aaagtgaata	tcggtttgggt	atg
ttgggagggtc	gaggtaggtg	gattacgagg	tta
ggtgaaatttt	tgtttttaatt	aaagatatata	aaa
atttgtaggt	tttagttatt	agggagggttg	agg
ggaggttgta	gtgagtcgag	attgcgttat	tgt
ttttattttta	aaaaaaaaaaa	aaaaagaaaaa	gaa
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gttttttttagt	ttt
ttgttttttgt	tttagtgtat	attttgtttat	tgt

```

gttttttggg ttttgatttc gtttgtgggt attttttgt taggtagttt ggtaggttt 3600
t t t t t g g t g t   a g a t t t t a t t   t t t g g t t t t t   t a g
g g g t t t t t a t   t t t t t a g a a t   a a t t t t g t t t   t a g
t g t t t a t g t g   g a t t t t g t g c   g t g t t a t t t t   t t t
g t a t t t t t t t   t t t t a t t t t t   t a t t a t g g g t   t g t
c g t t g t t t g t   t g t a g t a t g g   t t g t t g g g g g   a a a
c g t g t t t t a t   t t a t t t t t t t   a t t t a t t a g t   t t g
t g a g t t t t a g   t t t t t g t t t t   t a a a a t t g g g   t g a
g a g g a t t a a t   a g t a t a a t g t   a a a a g t t g g t   a g t
t t a t a t t a g t   a t t t g g g a a a   t a t t g t t a a g   t t t
a g a g t a g t t t   t a g a a t t t t t   t a t a g a t t a t   t t t
t t t t t t t g t a   t t a t t a t t g a   t t t t g a t t t g   t a t
g g a g t t t t a t   t t t g t t g t t t   a g g t t g g a g t   g c g
t t t a t t t t t t   g a g a a g t t g g   g a t t a t a g g t   t a g
a g t t g g t t t c   g a a t t t t t g a   t t t t a a g t g a   t t t
g a t t a t a g g t   g t a a g t t a t t   g c g t t t a g t t   g t a
t t t g t t a t t t   a g g t c g g a t t   a t a g t g g t a t   a a t
t a g g t t t a a g   c g a t t t t t t t   a t t t t a g t t t   t t t
a t t a t a t t t g   g t t a a a t t t t   g t a t t t t t t g   t a g
t t g t t t t t a a   a t t t g g t g t t   a a g t a a t t t a   t t a
a t a g g c g t g a   g t t a t t g c g t   t t g g t t t t g a   t t t
a a t a t t t t t t   t t t t t t g a a t   t a t t a g g t a t   t t a
t t g t t t t t g t   t t a t a a g a a a   a t g g g g a a a a   t g a
t t a a a t g a g a   t c g t g t a t g t   g a a a g t g a t t   t g t
a g g t a g t t t t   t t a t t t t t t t   g t t a a a g g a t   a g t
g t t t t t t g g t   t t g a t a t t t t   t t a g a g g a a t   t t t
g t t t a g t t a g   t t t t t t t t g g   g t g t c g a g t t   a a t
t g g a a g g a g t   g t t t t g g g g t   t a g g g t g t a g   t g g
a t t t c g t g t g   t g g t t a g a t t   t a t g t t t t a t   g c g

```

gtgtagggtgg atatggatga tgagggtgtgt gtgttgtgat igtgtgtgta tttttgtttg 5340

c g t a t g a t a a	g t a g g t t g t g	t g t g t a g g a t	t a g
g t t a t g g a t t	g a c g a g t t t g	t t t g t t g a a t	a t t
t t t g a a t a t t	t c g a g a t g a g	c g a g a g c g t t	a g c
t a t g t g t t t t	t t t t g t t t t t	t g g c g t t g g g	c g t
g g g g t g g t g t	t t a a g t t g a a	g g g g t a g t t a	a a g
a g a t t t t t t a	g g g t a t t a g t	g a g a g a a g a a	a a t
a a g a a a a g t g	g a a a a g t t t t	t t t t g g g g g a	a a a
a t a a t g t a g t	t a t t a t g g g a	a a a t t a g a t t	t g t
t t g a a g t a g a	a t a t g t a t a a	t g t t t a t a a a	t a t
t t t t t t t t t t	g a a a t a g a g t	t t t a t t g t g t	t g t
g g t t c g t t g t	a a t t t t g g t t	t t t t g g g t t t	a a g
a g t t g g g a t t	a t a g g c g t t t	a t t a t t a t g t	t t a
a g g g g g t t t t	a t t a t g t t g g	t t a g g a t g g t	t t t
t t t g g t t t t t	t a a a g t g t t g	g g a t t a t a g g	c g t
t t t a t a t a t a	t t t a t g t a a a	t a g t a t t t a g	a t a
a a a g t t t t t t	a g a a a t t g t t	t t t a g t t a g t	a t a
t a t t a t a t a a	t a t t t a a a a a	g g t a t g t a g a	g a a
t a g t t a t t t a	g t t t t t t t t t	t t a g g g g a a g	t t a
g t t g a g t t g t	t t t t t t t c g t	t t t g g t t t g g	c g g
g t a g g t a g t a	t t a t a t a t t t	t a g t g t t t a g	g g t
t t a g t t a t g g	t g a g g a t t t t	g t t t t t t a g t	t t t
t t g g g g t a g g	g t a g a g g t t t	a g g g a t a a g a	a t t
t t a g g g t t a t	g t t g t t t a t t	t t t t t g t t a t	a g t
a g a g g a g g g t	a t t t t t t t t t	t t t g t a a g t a	t t g
t t t t a t g g t a	g t t t t t t t g g	a t a a g g a g g t	t t t
g t t g g t g t a t	a g g a g t t t a a	a g t a t t g g t t	t t g
g g t a t t g t a g	t t g a t t t a t t	g a t g g a t t t a	g g t
t t t t t t g t t t	g t a a a a t g a t	a a a g a t a g t t	t t t

attagataag gtaigtaac gttattatag tatagcgttc ggtatttagt aggatttatt 7080

c g a t g a t a g t	t g t t a t c g t t	a t t a t t g t t a	t t a
g t a g t t g g t g	g a g g a g g g a g	a g a t g t c g t g	g g a
t a t t t g g g t t	t g g a g t g t g t	a a g g t a t a t a	t g t
g t g t a a t g t t	a t g t t t t t g a	g t t t t t g a t t	g t a
a t t t t t a g t g	t t a t t t t t g t t	t t g t t t t t t t t	t t t
a a g t g a g t t t	t t t t a a g g g g	t c g g t c g c g t	t t t
t a g g t t a g t g	g a g t g g t a g t	t t t a g a a t t g	g g a
a t t g g g a g t t	g t a t t t g a g g	t t t a g t t t t t t	g a g
t t t t t t a t t t	t t t g c g t t t t t	t t t t t t t t t t c	g g a
t g t t a t t t a c	g g t a g a t a g g	a g g t a a g g g t	g t t
t t t t g t t t g g	g t c g t t t a g g	t g g t t t t a t c	g a g
t g t t t a a g g g	t c g a g g t g t t	t a c g g t a g t t	t t t
g t g a t t t t t c	g t t t t t c g t t	a g g t a g g t g g	g t t
t t t t t t g t g t	t a t t t a g g t t	t t g a a t t a t t	t a t
t t t c g t t t g t	t t t t t t g t t t	t t a a t t t t t a	t a t
g t t t a t g t g t	g t t t t t a t t t	a g g a t t t t a g	t c g
t a t c g a t t g g	t t t t a t c g t t	t g g t g t t t t g	t a g
g a t t t a g a a t	t t a g g g g a t t	t t t a t g a t t t	g t a
a g a g t t g g t g	g a g t a t t a t a	t t t a g t a g t a	g g g
t a t t t a t t t t	a a g t a t t c g t	t g a a t t g t t t	c g a
t a t t t t c g t t	a t t t t t a a g t	a g g g a t g a g t	c g g
g g g a g a t t g g	t a g t c g g c g t	t g t t t a t t t t t	t t a
g t t t t t a a t g	t t t t t t t t t t t	t t g t t g t t t t t	g g g
a t t t t t t t t a	t t t a a t t t c g	a g g a a g t t a t	a g a
t t g g t c g t t g	t a a t t t a g g t	t t t a t t g g a g	a t a
t c g t g t a g g t	t a g t t t t g t t	g t t a g a a a g t	t t t
t t t c g t t t g t	t t t t t a t t t t t	a g t a t a t g t t	a g g
g a t g g g g a t g	a a t g t t t g t t	a a g a t a t t t g	a t g

ggtttgtttt ggggggttaa atagggtttc ggtttaaata gagattattg agagtiacgat 8820

g t g a a g t g t t	t a t t t g t g t a	a a g t g t t t t a	c g t
g t a t t t t t t t	t t t g t g g t t t	t t t c g a t t t t	t t t
g g t t g g g g g t	t t t g a a t g t t	t t t t a t g a t a	t t a
t g t t a g a t t t	t t t t a g a g t a	a a g g g t a g c g	g a a
t t t g g g t t a a	g t c g a t t t g t	t t t t g t c g t g	g a t
a t g a t c g g g a	a t t t t g t t t t	t g t t a g t t t g	t a g
g t a t t a a t a t	t t t t g g t t a a	g g t a t t g a t t	g a a
a g t t t t g t g g	t t t a t t t g g g	a g g t t t t t t t	t t t
t t t t t t t g t g	a g t t t t a t a t	g g t t g g t t t c	g t g
t c g t a a t a t t	t a g g g g g t t t	t t g g t a t c g a	g a t
t t t t g t t t t t	a g t t a g g a g a	g g a g g a c g g g	t t g
g t a g g g t t t t	a g g a g g t t t t	t g t a g a g g a g	g t t
a g a g a g a g a a	g g a a g g g a g g	g t a g t g t c g g	g g c
t g g a g g t t t t	t t t g g g t g a t	t c g t t t t a g g	a g t
g t g a g a g g t t	t t t t t t t t t a	g g t t t t g t t g	t g t
t t t g c g a g a a	t t t g t a t t t g	t t t t t c g g t g	g t t
t t g t a t g g a g	a t t t t t t t a t	t t t g g g g t t t	g a g
t t t g g g g t t t	t a g t t t g t t t	t t a g g c g g t g	g g t
t t t g g g g g t t	t t t c g g t t g g	a g t t a t t t t c	g g g
g g t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t a t t t t t g c g	g t t
t t t g g g t t g a	g g a a a t t t t a	t a a t t t t a t t	t t t
t t t t t t t t a t	t a c g t g g t t t	t t t g t g g g g t	t g g
g g a a a g g g g t	g t g t t t c g g g	g a a a g g g t t t	a g t
a a a t t c g t t t	g a a t t t t g g g	t t t t t t t t t a	g t g
t t a t a t t a t t	t t t t t t t t a g	t g g g g t t g t t	t t t
t t c g t t t t t t	t t g t g a t t t g	a g t t t g t g t g	t t t
t t c g g t t t g c	g t t t t t t t t t	g t t t t t g g t t	t t t
a g a t t t a t t t	t t a g t t t t t t	t t t t t t a a a t	a t t

tagaggtaggg ttttgggttc gaagttcggg tagaattttg gaggttagga tggtttgaat 10560

t t g g g a g g t c	g a g g t t g t a g	a g a g t t g t a a	t c g
g a g t t t t g g a	a g t t t g t t t t	a g a g t t a g t t	a a g
g c g t t a g t t t	t t t t a t t t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a t t t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g t t t g a	t t t t c g g t t t	t t t t t t g t g a	a t g
t t g g g t t t t a	t t t t t t t t g a	c g t t g t t t t t	t t t
g g g t a g g t a g	a g a c g t t g t t	g t a g g t t a a g	g g c
a g t t t t a g t t	a g t t t g g a g a	t t t c g t g t t t	t t t
t t a g g t t t t t	c g t t t a g g g t	t a t t t a t a t t	a a g
g g c g g g g g a g	t t t t t g t t g a	g g t t t t t g t t	t g t
t t g t t t g g g t	t t g a a t t t a a	g g t t g g g g a t	t t a
g t t t a a t t t g	g t t t t t t t t a	g g g t g g a c g t	t a t
a g t t t t a c g g	a t t t g g t g g a	g t a t t t t t a a g	a a g
t t t g t t t a t t	t g c g g t a g g t	t a g g g g t g g g	t t t
t t t t t t a g a t	g t g a g t t t t t	g g g a t t t t t g	a g t
a g t c g t a t t a	t g t t a c g a g g	g t g a a t g c g g	t t g
a t a a g a a g t a	g g a g t t c g a g	g a t a t a g t t a	a g g
a t g g t g g g g a	t c g g t a g g g t	t g g g g t a g t t	g a g
c g g a t a t t t t	t t t t t t t t t g	t t t a t t t t t g	t t t
a t g g a t g t t t	t t t t t g g g a g	t t g a t g t t t a	t t t
a g t a g g a g g t	g a a g a a t t t g	t a t t a g c g t t	t g g
a g a a t c g t t a	t a a g a a t a t t	t t t t t t t g t g	a g t
a t c g t t t t t g	t t t t a g t t g t	t t t t t t t t a t	t t t
g g g t t a t t t t	t t t a t a t t t t	t t a t a g a g t t	t t t
t t a g a a g t g t	t t t t t t a t t a	t t a g t a g g t a	g g t
a t t t t t t t a t	t t t t t t t a t a	t a g a t g a t t t	t t t
g t t t t a t g g t	t t t t g a g a t t	a g a a t g g t t t	g t t
g t g a g t t t t t	g g t t a a t t t a	g a t t a t t t c g	t t t

```

agtcgagtga ttigttaggg acgggaatagt aatattttcg ggttcgatta tattaatgtt 12300
a a t t a t a t t a   a g g t t a g t a g   t g t g g g t t a c   g t g
t t t g t t t g g t   g g g g g g a t t t   t a g a t t t a g a   g a t
t g t a t g g g t g   a g g g t g g t a g   t g g t t t a g g g   t t t
g g g g t g c g t t   t t t t t a c g t t   t g c g t t t a g a   a t t
a g a t t t a t a t   c g t t a g t t a g   g g t t g t t t g g   a g g
c g t g g t a g g a   g a a t a g t c g t   g t t a t c g t t a   t g a
t a g g g c g t t t   t t t t t t t t t c   g t a t t c g t t t   t c g
g a g t a g t t a g   a t g t t a g g g t   a g a a a g g g a t   t t t
a a a t t g a g g g   t t a g t g a t a a   a g t t t c g a t t   a t a
a t t t t t g g g t   t t t t t t g a g t   t t t a g a t t t a   g g t
t t g t t t t a t t   t g t t t g t a t t   t a g g t t t t t t   t t g
a g t t t g t t t t   t t a t t t t g t a   g g t t t t t t t t   a t a
g a t t t t a t t c   g t g a t a t a a a   t t g g g t t a a g   t t t
t t t t g g t t a t   t t t t g g g a t a   a a g t c g t a t t   t t a
t t t t t t t g a t   t c g t a t g t t t   t t t t t g a a g g   t t t
a g g t t t t t a g   t t t t t t t t t g   t a t a a g t t t a   t t t
t a t t t t t g t t   t g g t a g a t g t   t t c g t t t t t g   a a g
g a a t t t a g g t   t t t g t t t t t t   t t a g g a t t t a   g a g
t t t t t a g c g c   g g t g t t t t t t   t c g g t t a t t t   g t t
a t a g a t t g g g   t g t t a t t t g t   g t t t g t g a a g   t t g
g t t t g t t t t g   g t a a c g t t t g   t t g a a t g a t a   a a c
g t t t t a t t a t   t t g t t g g t g g   t t g a t t t g a g   a c g
a g t t t a t t c g   t t t a t t t a a t   a a a t g t t t g g   g t c
g g a t t t g g g a   t g g g t t a t a g   t g t t t t g t t t   t g t
t t a g a a t a a a   t g c g t t t t a t   a t t g g t t c g a   g g t
t t t t g t g a t t   a a t t g c g g g g   a g t a t g a t a t   a a t
t t t t t c g t t g   g a t a a t g t g a   g t g g t t t t t a   c g t
g g a t t t g t t t   t t t t t t t t g g   t c g g g t a g g g   t g a

```

ggggtattga ttttaigtgtt tccgttttagg gagatttgat tccggagatt tggattattt 14040

agtaatttgag	t t g g t t c g a t	t a t g g g g t t t	t t a
tggattagat	t a a t t a g c g g	t a g g a a a g t t	t g t
gtaggtagagg	a t g a t a a t t t	t g a t g g t a g t	a g t
tgttatgagt	t g t t a t a a g t	a a t a t a a a c g	t t a
tttttcggttt	t t t t t g g g t t	t t t t t a t g g t	t t t
ttagtttttat	t t t g g t t t t t	t g t t t g t g g g	t a t
tattttcgttt	a a t t t t g t t a	a a t a t a g a g g	a g g
ttaagttagt	t a g g g t a a g g	t c g g g t a g g t	a t t
cgttttttttt	c g a g g t t t t a	t t t t g t t g g t	t t t
tgttttttttat	t t t t t t t t t t	t t t t t a t c g g	t a g
ttgttttttttt	t t t t a g t t t t	t t t a g g t a g t	g t t
gatgggtgat	g t t t t t t t g g	g g t t g t a t a t	a a t
tgattaggag	a t t t t t g g t a	a g g t g t a g a g	g t g
ataggtagagt	t t a t t g a g t t	g g t t t g g t t t	g g g
tttttcgttta	t t a g t t g t g t	g g t t t t g g a t	a a a
ttttataattgt	a a a a t t a g g a	t t t t a g g g t t	g t c
gtggttgga	t t t c g t t a g t	t t t t a a a a a t	t g g
ttaggtagag	a a t a g g g g a a	t g g g a a t t t g	t t t
tggatttttag	g t t t g c g a c g	g t t t t t g g t t	t t t
tgggatagggg	t a a g t c g g t t	g a a t t t a g a g	g t g
ttttgtttttg	t g t t t t t t t a	g g g a t a g g t t	t a t
gttatataata	t a t t t a t a t a	t t t t t t g a a a	g t t
aagggaagtgg	g t g t g g g g g g	t t a t t t t t g a	t a a
ttaggggtatt	a g t t t g t t g g	g t t t a g t t g a	g g g
ttgttttaggg	t t g g g a a a g g	a g a g a a a t t t	t t t
ttttgtgtttt	t c g t a t t t t g	t t g t t t t a g g	g t t
ggaaaaggga	a g t g a a g t t a	t g t t g a g a g a	c g t
gaggggtttag	g g t a t t t g g g	a g t c g g t a g g	a t a

ttcgggggtgg gggtagttat ttattaggag tgaggagtcg gcgcgaggag tggaggaggg 15780

a a g g a t g g t g	g t a g t t g g g g	a g t t a g c g t t	a g t
t a t g t a g a g t	t g g g t a a a t t	t t t a t t a t t a	t t t
t t a t t a t t g g	a g g t t t a g g t	t g t t t t t g t g	g t g
t t t t t t t t t t	c g g g g a g g g t	t t g a t t g g t t	t t t
c g g t a t c g g t	c g t a t a g g t a	t t a t t a t t g t	t a t
t a a g g g t g a g	g g g t a t t t g g	g g g t t t g g g g	g t g
t t a t g t t t g g	a t t t g a g g t t	t g a t t g t t t t	t t a
t t a g a a g a t t	a t t t a g a t g g	t g c g g g c g t a	g c g
g t a t a a g t t t	a t t t a c g t g g	t t a t c g t t t a	g t t
g g t t t t g t a g	g t g c g t g t a g	a g t a g g g t t t	g g g
g t g t t a t t t g	g t t t t g t t g g	g a t t a t t a t t	t t t
a a g g g t t a g g	a g t c g g a g t a	c g g g a a t a t t	a t t
g t t a a g g t t t	t t c g t a t t t c	g t t t a a g t g a	g t g
t t t t t t t g t t	t t g t t t a g t t	c g a t t t t t a t	t t t
g g g a t t t g g t	t t t a a g t t t a	g g t t t g g t t t	t t a
g t g t t t a t a c	g t g t g g g t t t	t t g t t a g g t a	t t a
t t t t g t t t t t	t a g g a g t t t g	g a g t t t a g t g	t a g
g g g g t g g t t a	g a g g g g a t t g	t t a g t g t c g g	g t t
a a t t g t t t g t	a t t t g t t t t t	t t g t a t t c g g	t t g
t t t g t a t a t t	a a g a a t a a g a	g g g a g g a g a a	a g t
g a a g a g t a a g	g g t t t t t t t a	a g a g g a a g t g	a g c
a g t t t t t t t g	t t t g g g t g t t	t t t t t t g t t t	t g t
t t g g g t g g a t	g g g g t g g t c g	t a g t t t t a t t	t t g
g t t t t a t t t t	t a g g t t t t a g	t t a t t t t t t t	a t t
a g t t t t g a t t	t t g t g g a a g t	a t t t c g c g a t	g g a
t t t t a t t t t t	t t g t a a t t t a	a a t g g t t g t a	t t t
a g t t t a g t t a	g g t t t t a g g t	a g g g t t a a t t	t t t
t a t t g t g t g t	c g t t t t t g a g	t t t t t t g t t t	g t t

taggaatgggt aatigtgtgt gttttcgtgc gtgtttcgcg igaaagtttc gtttttcgtt 17520
a g a c g g a c g t g g g t c g g g a t t t c g t t t c g t a c g
t t a g t t t t t t t t t t t a a a a t g g a g g g c g a t t a t
a t g a c g g t t g a c g a t a a g a c g g g t a t a g t g a t t
a t t a a a a g a t t a t a t a c g t t a g t t t a g t t t a g g
g c g g a a a t t g a g g g a t a g a a a a a t t a a g t a a t t
a t g g a a t a g t g a g g t t g g g a t t c g a a t t t a g g t
a t t t t g g a g t t g t a g t t g g g g t t a t t t t t a g g g
g a g t t t t a g a t t t g a a t t a a g a a g a g t a g t t a a
t t c g g t t g c g t t t t t t t t g g c g g g a a t a g g g a t
t a g t t t t t t t t t t t a t t t a g g t c g t t g t t g t t t
t t g g t t g a c g t g a a g a g t g t t t t g t t t t t t g t t
g g g g t t t t t t t t t t a t t t g a a a t a t t g g t g t t t
t t t t a g g a a g t g t t g g c g t t t a t t t t t g g a a a g
a g a g g t t g g g c g t g t a t t a t t t a g t a a a t t t t t
a t a g t t t t t c g a t t t t t t g g a a t t t a g g a g g t t

<210> 6
<211> 18404
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<223> bisulfited genomic DNA

<400> 6

```
ttttttttgat tagtttttta agtttttagga ggt
ggggggttttg taaggatttg ttgagtaatg tac
gttgttttag ttttttagg agtgggcgtt agtattttt gagggatgat tttatcgg 180
tttattttttt aggataattag tgtttttaaat aaa
aagggaaggagg ggataaaaaaa taaagtatttt ttt
taagaggataa agggtagtag cggttttggat gag
ttgaggagttt tgttttttggt ttcgtttagag ggg
gtttttcggtt gtttaattatt tttttttagtt tag
gattagggtt ttttttgaggg tggtttttagt tgt
gggggttagat agttttgggtt cgaatttttag ttt
gtaagtgaatt aagttaattta gtttttttttgt ttt
tgatagaagt gtttagattg aattaacgtg tgt
agcgtgtgat gagttattgt gttcgttttta tcg
attatttttgt tatgatcgtt ttttattttta aag
ttatttttttt acgtgcgagg cggagttttcg att
tttacgcgag gtacgtacgg aggtatataat agt
tttattttatt gggtaagtaa aggggttttaga ggc
tataaggagg gaagggttgg ttttggtttgg ggt
agagggtgggg gggaatgtagt tattttaaat ata
ttgtgagttt gtttatcgcg aaatgttttt ata
```

gggagtgagg	gagtgagagg	gtagttaggaa	ttt
gttgggaagt	atagaatgag	gttgcggtta	ttt
aaggatatag	ggtagggtag	ggaggatatatt	tag
aggatagtatt	cgttttattttt	ttttttgagggg	aat
gttggtttttt	tatttttttttt	ttttttttttgt	ttt
ttttgtgttt	gtagtcgggt	gtaggggggggt	aag
tagtataggg	ggattcggta	ttggtagtttt	ttt
agttacgggtt	tttgtaattag	atttttaagt	ttt
gagtgcggttg	ttggtaattta	gtagagggttt	ata
aatagaagggg	gtgagaattta	agttttgaatt	tga
gtttttttttta	gaaagtgagg	atcggggttgg	gta
gtagtiagggttatttattt	ggacgagggtcgggagggtt	tggtatgggtatttttatg	1920
gttgggggat	aggtgatgtt	ttcgtattttc	gat
agggatagtgt	ggaagggtggt	ggtttttagta	ggg
tttttttttttt	tttttaggttt	tgtttttgtac	gta
tgggttttaaat	gaattgggctg	atgggttacgt	aga
ttatgttcga	gcgttgcggtt	cgtatttatttt	gga
ttagggtttgg	gtgggggggta	gttaaaattttt	agg
tgtttattttt	ttatttttttaa	attttttagggt	gtt
tgagtatgtc	gatgataaatg	atgggtgttttg	tgc
gggggtgttat	tagagggttag	ttaaagtttttt	ttc
ttagtttttag	gtattatagg	agtagttttga	gtt
ggttatcggg	taagtgatga	tggagggttttg	ttt
ggtttttgagg	tgttgacgtt	ggtttttttag	ttg
gcgtcgaattt	tttattttttta	gtgagtggtt	gtt
aatttttattta	ttgtttttgtc	ggtttttttagg	tatt
ggagttatgg	agcgttttttt	agtatgggttt	tatt
agggaaggga	tagtttttgag	atagtaggggt	gcg
agtagtgtag	taggaagt	tttttttttttt	tta

t t t t a g g t t t	a t t t t t a g t t	g a g t t t a g t a	a g t
t t a a a t t t a g	a t t g t t a a a a	a t a a t t t t t t	a t a
a a a g g t t a t g	g g g t t t t t a a	g a a g t g t g t g	a a t
a g t t t t c g g g	g a t g g g t t t g	t t t t t g a g a g	a g t
t t t a t c g g g g	g t a t t t t t a g	a t t t a g t c g a	t t t
g g g g a a g a g g	a g g a a g t t a g	a g g t c g t c g t	a g g
g g a t c g g g g t	a a g g t a g g t t	t t t a t t t t t t	t a t
a g t a a t a g c g	t t t a g t t t t t	g a g g g t t g a c	g g a
t g a g t t t t t a	c g a t a a t t t t	g a g a t t t t g a	t t t
a a g t t a a g t a	a t t t g t t t a a	g a t t a t a t a g	t t g
t t t t t t a t t t	a t t t a g g t t a	g g t t a g t t t a	g t g
t t t g t a g t t t t t a t t t t g t	a t t t t a t t a g	a g g t t t t t g	a t t a t a a a t a t g c g g g t a g a 3660
t a g a t a g a g g	a g t t a t g t g t	a g t t t t a a a g	a a g
g g t t a g g a t g	g g g t a t t g t t	t g g g g a a g t t	g g g
a a g t t t t g c g	g t t a t c g a t g	g a a a a a g a g g	a g g
t t t t g g g a g a	a g a a a t t a a t	a g a a t g g g a t	t t c
g g t t t a t t g t	g g g t g t t t g t	t c g g t t t t g t	t t t
g g t t t c g g g t	t t t t t t t t t g	t a t t t g g t a g	g g t
t t t t g a g g a a	g a t a t t t a t a	g g t a g a g g g t	t a a
t t t a g g g t t t	t g g a g t t a t g	a g g g g a t t t a	g g a
a a t g t g c g a g	t t a a c g t t t a	t a t t g t t t a t	a a t
t t t t a g t t g t	t a t t a t t a t t	a t t a g g a t t a	t t a
t t t t g c g t g a	g g t a g a t t t t	t t t g t c g t t g	g t t
t t t a g g t t t a	t t g g g g a t t t	t a t g g t c g g g	t t a
t c g a a t t a g g	t t t t t t t a a g	t c g a g g a t a t	a g g
t t t t a t t t a t	t t t a t t t t a t	t c g a t t a g a g	a g g
a a t g g g g t a g	g g c g t g g g g g	t t a t t t a t a t	t g t
g t t t g t a t t c	g g t t g t g t t a	t g t t t t t c g t	a g t
g t t g t a t g t t	t a t t t c g g g t	t a g t a t g g g a	c g t

ggggatgagg	tatagagtag	ggtattgtgg	ttt
tgttttggtat	cggttttaaat	atttggttgga	tgg
atttggggttt	tcgtttttaga	ttaattatta	ata
tcggtatatt	cgttttgttat	ttaataaacg	ttg
tgtaaatttat	atagtttttat	agatatataat	aat
gagttttatag	agataggtga	tcggggggaga	tat
cgtaatttttt	tttttagggtt	ttggaggga aa	t aa
ttcgggttggtg	ttttttaaaaa	cgagggtatttt	g tt
tttttagtag	aaaaatgagtt	tgtgtataaaga	a ag
ttggggggcgg	tgagtttttta	agagaagcgt	gcg
atgtttaggtt	ttagagtgcg	attttattttt	aaa
tagaaaggaa ggaatttgat	ttagtttgig ttagcgatgg	gattatttta atggtagtat	5400
agaggggtggtt	gtgtagggggg	agtttgtaggg	gta
ggtagggagg	ataggaggggg	tttggaatgta	gat
gatatgtttgg	aatttgggtt	tggagttttag	a ag
gggttacggtt	gtgtagtcga	gattttgttta	tta
tttttatatttt	tgagatttttt	ttttgtttttg	gta
gattataaagt	acggggggcgg	atgcgggggaa	ggg
ttttcggggtg	gttatgacga	tgatacgggtt	g tt
attgatacgtg	gttttttagat	aatttttgggtt	ggc
gttttagtagt	tggtttttgga	cgtaagcgtg	gag
tggttttagta	taggtttttga	attattgttta	ttt
tttggttttagt	tgttttttgga	tttaggggttt	ttt
gttttttttttt	ttacgtgggtt	tataattgttg	att
gattcggggga	tgttatattgtt	tcgttttttgt	agg
gggcggagag	gaggcgagat	ggttttgggtt	agt
tttttttgagt	taataaggtta	ttttgggtttt	aga
gtagtagggg	tggggggaatta	tttgtaatgga	ggg
agtaggggggt	aatttgttttg	ttgggtgggtgg	gga

t t g g a g a a g g	g g g a g g t t t t	g t g g g g g g t g	t g g
t g g a g a t t t g	t g a g a t g a g g	g g a g g t a g t t	g g g
g t a g t t t g g g	t g t t t a t a g g	g g a g a a t g t t	t t t
t c g t t g t t t t	t t t a g a c g t t	g g t g t a a g t t	t t t
t g t g g g t g g g	g a a a t g a g t a	t t a g t t t t t a	a a g
g g g t g g g t t a	g g a g t a g a g g	t g g g t a a g g a	g g g
g t t g t t a t t a	t t t t a g t t g t	t t t a g t t t t g	t c g
t t a g a a g t t a	g t t t t g g t t g	t a t t t t c g g a	t t t
g t t t t t a a t g	t t a g t c g t a t	t t a t t t t c g t	g g t
a g a a g t t a g t	a a t t t a g a g a	t t t t a g a a g t	t t a
g g g a g g t a g t	t g g g t t t a t t	t t t g a t t t g t	c g t
t t a a t t t c g t t t t t t g a a	a t g t t t t a t t a g g t t c g t g a	g g t t g t c g a a g g t t t t a a a	7140
t t a t t t a t t g	t g t a g c g t t t	a t t t t g g g g g	g a g
g t t t t t t t t t	t t g g g t t t t t	a g t t t t g a a t	t t a
a t a t t g t g g t	t a t a g a t a g g	a g t t t t a g t a	g a g
t c g t a t a t g a	t t t t g a t g t g	g g t g a t t t t g	a g c
t t a t t g a g t a	t a g a a a g t a c	g a a g t t t t t a	g g t
g t t t a g g g t t	c g t t t t t g g t	t t g t a g t a g t	g t t
t g g t a t t a t t	t a g a g a a g g t	a g c g t t a g g g	a a g
t t g a g t a g a g	a t a t t t a t a g	a g a g g g g t c g	g a a
t g c g t t a t a t	g t t t t t a a a t	t t a t t a t t t t	a t t
t a g g t a t g a t	a t t a t t t t t a	t t t t a t a g a t	g a g
g g t t t a g g g t	t t t t g a t t g a	t t t t a g g g t a	a g t
g t g t a g t g g c	g c g g t t a t a g	t t t t t t g t a g	t t t
t t t t t a g a g t	t t t a a t c g g g	t t t c g a a t t t	a g a
g t a a t a t t t a	a a a t a t t t g g	a g g a g a g a a g	t t a
t g t g t t t t a g	t a g a g a t t a g	a g g t a a a g a g	a a a
t g g t g g g a g a	t g g a t a t a t a	g a t t t a a g t t	a t a
a g g g a g g c g g	g g a a g a t a a t	t t t a t t g g g g	a a a

ttggatgatg	ttattgaagg	ggagtttagg	gtt
tagaaagtag	aatttaagttt	tttttttcgaa	gta
ttttataaag	tttagtttta	taggaaatta	cgt
gggagagagt	gagaagtgag	gttgtagagg	ttt
gtaaaattttt	taatcgtagg	gatggggggga	agg
ttttatatttt	gttcggagggt	gatttttagtc	gag
gggttatattt	agtttatcgt	ttgggggatag	gtt
gagtttttttt	tttttaggttt	taggatatagg	aag
aggaagcgtat	gagttatcga	gggatatagatg	t aa
taaggtagag	gatatagtag	aattttgggag	aaa
gggtgatatt	ggttttttggg	acgggtttatt	t aa
tttaattttt	cgtttcggta	ttgttttttt	tttttttttt
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttttttttga
8880			
atttaggttt	tagtttttttt	tgtagggggtt	ttt
taggtattgg	ttagtttcggt	tttttttttttt	ggt
agtttttagag	ggttttcggtg	ttaaaagtttt	ttt
tagggggtag	atacggagtt	agttatgtga	ggt
aggtcgatatt	aggaaaggag	gttttttttagg	tgg
tagtttttaag	ttttaatttag	tgtttttgatt	aaa
tttttagagag	gttgtaagtt	ggtagggagta	agg
tgaatgtagg	gattttacggt	aagggttaagt	cgg
tttttagcgtt	atttcggttgt	ttttttattttt	aag
gaaaggagtt	atgggtgttat	gaggagttatt	tag
gggagattat	aggaggagtc	ggggagggtta	tag
tgttcgggat	agcgtgagat	attttatata	ggt
ttttttgtttg	ggtcggagat	ttattttgatt	tta
ttgggataaag	gtatttaagt	ttttgggtaag	tat
tttttttatattg	ttttaatatg	tgttgggggtg	agg
ttagagggaag	aagagtttttt	taataaataga	gtt
agtgggttttt	ttgttttttag	tgggatattgg	gtt

c g a g g t a g t t	t t t t g t g g t t	t t t t c g g g g t	t a g
a g a t a t t a g g	t t t t a g g a t a	g t a g g g a g g a	g g g
a g g g g a g g g g	a t g g a g g g t a	g g t a g t g t t g	g t t
t a g g g t g g g a	g t c g g t t t a t	t t t t g t t t g g	g a a
t a t t a g t g g g	a t c g g a g t a g	t t t a g c g g g t	a t t
t t t g t a g g a t	a t t t t g t t g t	t g a g t g t a g t	a t t
t t t t t t t t t t	a t a t a g g t t a	t a g a a a t t t t	t t g
g a t t t t t t a t	t t t g t a g g g t	a t t a g g c g g t	g a g
a g g g t a g g g a	t c g g t t g a g g	t t t t g g g t g g	g g g
a g g g a t g g g g	a g t g t g g g g g	t t g g g g g t a a	g g g
g g g a a t t a g g	a a t g a g t g g t	t t a g g g t t t g	g a t
g g g t t g c g g g	g g g t t a t t t	a t t t g a c g g a	g a g c g a g a a g
t t a t t g a g g	t t t c g g t g a a	c g t g g a t a t t	t c g
c g t g g g t a t t	a g g t a t t t t t	a t t a t t t g g g	c g g
t t t t g g g g g t	t t t c g g a g a g	g t t t t t t g t t	t a t
t a g g t a g a g a	g t t t a g g g a t	g a a g g g g g c g	t a g
a t t t t c g g t g	g t t t t a g t t t	t a a g t t t t a g	a t g
g g g g a t a g g a	a g a g g c g c g g	t g g g g t t g t t	a t t
a g t a t a g t a a	g g g a a g a g a a	t c g a t t t t t t	g g g
t t t t a t a c g t	t t g t a a t t a a	g t a g a g t a g g	g t g
g t a g t a a g g a	t a t a t g t g t g	a g g t t t a g g a	g t a
a a t t t a g a c g	g t t t t a c g g t	t t t t g t a t a t	t t t
t t g g t t t a c g	t t a a t a a t a a	a t t t t t t t t t	t t t
t g t c g g g c g t	t g t g t t a t a a	t g a t g g c g g t	g a t
t t t t a t g a a a	t a g g g g t t a t	t g g c g t t t a t	a t g
t t t a a g g t a t	t g t t t g a g t t	t t t t a t t a t t	t t a
t a g t t c g g t t	t t a a a g t t a g	t a t t a g t g a g	t t a
a a t a g a g a t t	a a g a g t t t t t	t g t t t t g a a t	t t t
		t t g t t t a a a g	g g g

taagatttttg	ttaatgttttg	taagagagaaa	ggg
ttgttttatgt	tattgtggta	gaggggatgga	t aa
gggtttttttt	taatttttttgt	tttttaggttt	ttg
tttattttttt	ggggggttggg	ggataagggtt	ttt
tgatttttaga	ggtttttaaat	attaagggtat	atg
aaatatattaat	atcgtttaaat	taaaacgagg	aaa
atataatatgt	gtgggtttttt	ttagggagggg	aaa
gagatatatttg	gttttttttata	tatttttttttg	aat
ataaaaaataa	atatgtttaat	tgggaataaat	ttt
tttttttgtttt	ttattttggat	gttggttttgta	tgg
cgtagtggtt	tacgttttgta	atttttagtat	ttt
gttaggagat	cgagattatt	ttggtaata	ttggtaaatt
ttttttttat	taaaaaatata	12360	
aaaaaaattag	ttgggtatgg	tgggtgggcgt	ttg
taggagaattt	attttgaattt	aggaagtcga	ggt
atttttagttt	ggtaatatag	taagattttta	ttt
ttgtgtgtttt	aatattttatg	aatatttatgt	atg
ttttaagtttt	aatagtttta	atttttttttat	gat
aaatatattaat	gttttttttttt	aaaaaaagggtt	ttt
attttgtttttt	ggtttttttttt	ttttattgggt	ggt
gtatgggtttta	gtttttgattta	tttttttttagt	ttg
gcgggaattttt	tacgttttaac	gttaagggagt	aag
gcgggatattt	cgttggcgtt	ttcgttttatt	tcg
ggtatttgagt	aagtgttttaa	taaaataagtt	cgt
agtatagtttt	tttgggttttta	tataatatagt	ttg
tatagtttata	gtatatatat	tttatattttt	atg
gtatatattttt	acgtatggaa	tataaaattttg	att
gtattaaacg	tttatattgtat	tttgggttttta	aga
ggtgggaagg	aattaatttcg	gtattttagaa	gaa
tgggaaggagg	aggaaattttt	ttgaagggtg	tta

g t a t a g t t t t	t g t t a t t t t t	t g g t a g g a a a	a t a
g t g t g g g g t t	t g t a g a t t a t	t t t t a t a t a t	a c g
t g a t g t a g g a	a t t a t t t t t t	t t a t t t t t t t	a t g
a a t t a t a a g a	g t a a a t g t t t	g a t a a t t t a g	a a g
g a t a a a a g t a	g a g a t t a a g g	t t a g g c g t a g	t g g
g g g g g t g a g g	t t g g t g g a t t	a t t t g a t a t t	a a g
a a a t t t t g t t	t t t a t a a a a a	a t a t a a a a t t	t a g
t t t a g g t a t t	t g g g a g a t t g	a g a t g g g a g g	a t c
a g t g a g t t a t	g g t t g t g t t a	t t g t a a t t c g	g t t
a a a a a t a a a a	a t a t a g t t g g	g c g t a g t g a t	t t a
t c g a g g t g g g	a g g a t t a t t t	g a g g t t a g g a	g t t
ttttattttt attagtttgt	aatttttagtt ttttagggagg	tgaggttgt agtgagtcga	14100
g a t t a t g t t a	t c g t a t t t t a	g t t t g g g t a a	t a g
a a t t a a a a a t	t a t a t a g a t t	a a g a t t a a t g	g t g
g t a a a t a a g g	t a a a a t a a t t	t g t a g a a a g t	t t t
g t t t g a t a a a	t g a g t t t a a t	a a t a t t t t t t	a a a
a g g g t t t t a g	t g t t g t t a g t	t t t t a t a t t a	t a t
g t a g g t g t t a	t t t a t t t a a t	t t t a g a a a t a	g a a
g t t t a a g g t t	a t a a g t t a g t	g a g t a g g a a g	g t g
g t t t g g t g t t	t t t t t t t t t a	a t a a t t a t a t	t g t
t g g g t a t t g t	t a t a g t t t a t	g a t g g a a g g t	g g a
t g g g t t a g g g	t a a a g a g g t g	g t a c g t a t a g	a g t
a a g t t a t g t g	g t t g g a g t a a	a g t t g t t t t g	a g a
t t a a g g t t a g	g t t g a g a a a t	t a a g g a t g a a	a t t
t t t g g t a g g a	a a a t g a t t a t	a g a c g g g a t t	a g g
c g g t g g g g t c	g a t a g t g a t a	a g a t g t g t a t	t g g
t a a g a a t t a g	t a g g g t t a g g	g a g t t a t t t a	t t t
g t t g t t a t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t
t a g g t t g g a g	t g t a g t g a c g	t a a t t t c g g t	t t a

t a a t t t t t t t	g t t t t a g t t t	t t t t a g t a g t	t g g
g t t t a a t t t t	t t t t t t g t a t	t t t t a g t t g a	g a t
t t t t g a a t t t	t t g a t t t c g t	g a t t t a t t t g	t t t
g t t t g a g t t a	t t a t g t t t a g	t c g g t t g t t a	t t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t c g	a t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t
t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t t t t t t t t	t t t
t t t t t t t g a t	a t a g a a t t t t	g t t t t a t t a t	t t a
t t a t t g t a g c	g t c g a t t t t t	t t g g t t t a g g	t g a
t g a g a t t a t a	g g t g t a t g t t	a t t a t a t t t a	g t t
t c g t a g t a g a	g a t g a g g t t t	t t t t t t a t g t	t g t
a a g t a t t t t t t a t t t t a g	t t t t t a a a t t g t t a g g a t t	a t t a t a t g t t t g g g t t a t t a	15840
t a t t t a g t a t	t t t t t t t t a a	t a g a g a t g g g	g t t
a t t t t t g a g t	t t a a g t a a t t	t t t t t t t t t c	g g t
g c g t t a t t t t	a t t t c g t t a g	g t t t t t a t t t	t t a
t g t t g t g g t t	t t g t t t t c g t	t t t a t t a g g g	t t t
t g t t t g t t t t	t a t a t t a g g g	t t t t g t g t t t	a t t
t t t g a t t a t t	a c g t t a t a t g	g t t a g t t t t t	t t t
g t t a t t t t t t	c g g g a a g g t t	t t t t t g a t t t	t t t
g t t a t t t g t t	a g t a t a t g a a	g t t g g t t t a t	t t t
g t t t t a t t t t	g t c g t t t a g g	t t g g t g t g t a	g t g
a t t t t t t a g g	t t t a a g t a a g	t t t t t t a t t t	t a g
t g t g t t a t t a	t a t t t a g t t a	a t t t t t t a t t	t t t
t t a g g t t g g t	t t t a a a t t t t	t g g g t t t a a g	t a a
t g g g a t t a t a	g g t g t g a a t t	a t t a t a t t c g	g t t
t t t g a g a a t t	t g t a a t g a t t	t a a t t t a t t g	g g t
g g a a t g t a a g	t t t c g t g a g a	g t a g a g a t t a	t g t
t a t t t t a a a t	a g t a t t t g g t	g t a t a a t a g a	t g t
g t a g g g g a a a	g g g a a g t g a a	a g g a a a t a a a	g a a

gtgcggagaa	gttggttgga	cgtgggaggg	ttt
tgagggtgttg	tgagttattt	aggggggatatag	gtt
agagggttgga	agtagaaatg	taatggagag	aat
ttaaagaggg	ggtagaggag	tatgagtgag	tcg
aagttttatag	ggatcggaaa	taggcgtagg	gta
cgtcggagtg	agtatttaata	aagtttttttt	ttt
tcgatgggtgt	tcgggatttta	tttacgggat	agt
ggcggagggt	cgtaggggggc	gggggttgagt	tag
ttagggtgagg	aagaatcgtt	tagtaatttag	tta
taatgggtatt	gtagggataa	atttttggtatt	aat
gggggttggtt	cgagatcgtt	tatagcgggtt	agt
agtaggttcg	tttgttggtt	tagggtcgtt	tttttcggg
agaggaggag	ttatttggag	17580	
tttttattttgg	agttttaagtt	gatagagcgg	cgg
agtaatttttg	gttgagggaag	agtaatttaaat	ggg
agggttttaag	gaaaaatttttt	aatagtttttag	ttt
ggttttatttta	tttaggggcgt	tgaggggatttt	att
ggggaggaggt	tttaggtagg	gttagggttttt	ggg
gggaggaggtt	gttttagggggg	atgggggttttg	gaa
tgggggggttgt	taggtttcgta	agagatttgat	att
ttgttttgga	tatttaagggtt	tttttttttttt	tgg
aggaggcgggt	tacgttgttta	ttagtagtag	gtt
gaaatagcgt	tttttagtttg	tttgatagggt	tgg
atttgattaa	gcgagtaaat	ttaaggatat	ttg
ttttaaggat	tagcgtgtttt	aagataatttg	gag
ttttttatttgg	ttgggtagttt	gtttgtttaaa	tag
gttttggaatga	tgataatttgg	tttataatttg	gta

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> A r t i f i c i a l S e q u e n c e

<220>

<223> D e s c r i p t i o n o f A r t i f i c i a l S e q u
S y n t h e s i z e d P r i m e r S e q u e n c e

<400> 7

c a g g c c a g t g g a g t g g c a g

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gaggagggtgc agctagtcctg

<210> 9

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

caggccagtg gagtggcagc cccagaactg gga
actgggagct gcatctgagg cttagtccct gag
ctcctc

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

caaagcactg gctttggaac c

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

atcgagtgag tcctgctgga t

<210> 12

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

caaagcactg gctttggaac cggactgtct ggg
actgatggac tcaggcaatg ccttaaactc cctgagccctc aggttccttg tctgtaaaat 120

gataaagata gcccctgttt catagggtg tgg
aacgccatta tagcacagcg cccggcatcc agc

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

tgtctggagg ccacggtcaa tga

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gtttgtattc ggttgtgtca tgctc

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

cccagttcat tgaaccact

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

ccttgctctt ctccttgtct

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

gaacgttatt atagtatagc gttc

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

tcacgcatac gaaccctaac g

<210> 19

<211> 159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 19

g a a c g c c a t t a t a g c a c a g c g c c c g g c a t c c a g
c g c c a t c a t t g t t a t t a g c g t g g g c c a g g g a g g
g g a g a g a t g c c g t g g g a c c g t c t g g g t t c g c a t

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is a base sequence figure showing the base sequence of the sense strand of the SHP1 gene genomic DNA used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[Drawing 2] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#).

[Drawing 3] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) and [drawing 2](#).

[Drawing 4] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 3](#).

[Drawing 5] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 4](#).

[Drawing 6] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 5](#).

[Drawing 7] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 6](#).

[Drawing 8] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 7](#).

[Drawing 9] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 8](#).

[Drawing 10] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 1](#) - [drawing 9](#).

[Drawing 11] It is a base sequence figure showing the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[Drawing 12] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#).

[Drawing 13] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) and [drawing 12](#).

[Drawing 14] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 13](#).

[Drawing 15] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 14](#).

[Drawing 16] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 15](#).

[Drawing 17] It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the

antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 16](#).

[[Drawing 18](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 17](#).

[[Drawing 19](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 18](#).

[[Drawing 20](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence of the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 11](#) - [drawing 19](#).

[[Drawing 21](#)]It is a base sequence figure showing the base sequence of cDNA of SHP1 gene used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[[Drawing 22](#)]It is a mimetic diagram showing the outline structure of SHP1 protein used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[[Drawing 23](#)]It is an amino acid sequence figure showing the amino acid sequence of SHP1 protein shown in [drawing 22](#).

[[Drawing 24](#)]In the genomic DNA (sense strand) of SHP1 gene shown in [drawing 1](#), it is a base sequence figure showing the part of CG arrangement methylated on a CpG island.

[[Drawing 25](#)]It is a chemical reaction explanatory view showing the process in which cytosine is changed into uracil in the heavy sulfite treating used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[[Drawing 26](#)]It is a mimetic diagram showing the state where cytosine is changed into uracil and the methylated cytosine is not changed by the heavy sulfite treating used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[[Drawing 27](#)]It is a base sequence figure showing the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand of the SHP1 gene genomic DNA used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[[Drawing 28](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#).

[[Drawing 29](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) and [28](#).

[[Drawing 30](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) - [drawing 29](#).

[[Drawing 31](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) - [drawing 30](#).

[[Drawing 32](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) - [drawing 31](#).

[[Drawing 33](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) - [drawing 32](#).

[[Drawing 34](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27](#) - [drawing 33](#).

[[Drawing 35](#)]It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after

carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27 - drawing 34](#).

[\[Drawing 36\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the sense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 27 - drawing 35](#).

[\[Drawing 37\]](#) It is a base sequence figure showing the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand of the SHP1 gene genomic DNA used with the hematopoietic organ tumor cell detection method concerning this invention.

[\[Drawing 38\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37](#).

[\[Drawing 39\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 and drawing 38](#).

[\[Drawing 40\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 39](#).

[\[Drawing 41\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 40](#).

[\[Drawing 42\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 41](#).

[\[Drawing 43\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 42](#).

[\[Drawing 44\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 43](#).

[\[Drawing 45\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 44](#).

[\[Drawing 46\]](#) It is an arrangement figure showing a continuation of the base sequence after carrying out bisulfite processing to the antisense strand in the genomic DNA of SHP1 gene shown in [drawing 37 - drawing 45](#).

[\[Drawing 47\]](#) (a) - (d) is a mimetic diagram showing the step of methylation specific PCR used by this invention, respectively.

[\[Drawing 48\]](#) (a) It is a base sequence figure showing the primer for PCR used in Example 1 whose - (b) is an example of operation of this invention, and (c) is a base sequence figure showing the base sequence of SHP1 gene (genomic DNA and sense strand) which the primer for PCR used by (a) - (b) recognizes.

[\[Drawing 49\]](#) (a) It is a base sequence figure showing the primer for PCR used in Example 2 whose - (b) is an example of operation of this invention, and (c) is a base sequence figure showing the base sequence of SHP1 gene (genomic DNA and sense strand) which the primer for PCR used by (a) - (b) recognizes.

[\[Drawing 50\]](#) (a) It is a base sequence figure showing the primer for RT-PCR used in Example 3

whose - (b) is an example of operation of this invention.

[Drawing 51](a) It is a base sequence figure showing the primer for real time RT-PCR used in Example 4 whose - (b) is an example of operation of this invention.

[Drawing 52](a) Are the primer for methylation specific PCR used in Example 5 whose - (b) is an example of operation of this invention a shown base sequence figure, and (c), (a) It is a base sequence figure showing the base sequence of SHP1 gene (genomic DNA and sense strand) which the primer for methylation specific PCR used by - (b) recognizes.

[Drawing 53](a) is a figure showing fluorescence in situ hybridization (FISH), and (b) is a figure showing one typical data of the analysis result of heterozygosity loss of SHP1 gene in an ALL patient.

DRAWINGS

[Drawing 1]

```
oosttattt gtgcoogtg tagcaaat gtatctatc aacacacag gacagaggc      60
ctgatcgct cgttttggc aacagatgc caagcagtg gaggagagt tatgtttag      120
actacaccc cctcaggtg tottagaac gtgtgtctt agggagagg ttgaccttc      180
actcccttt caggtgtcc ttaatttgc tegtgtgtc agtctatag aagccagga      240
tootgagat goagcgtgt caggcagct gaggcgtg ttctgccc cactgacct      300
gacacccat ggcctgtgt ctgtgagc cgtggccgc tootgagct tggccctcc      360
ttgtgacct gacagggag gaaagcctt gatgttcag aactatata atgacgtgt      420
gacttagct tgggtcagt ctctggaga cctgacaaa cactctata ctccctgat      480
toctatgac ttctagggc cactccact gacagctac toctatagt cctgtgtgg      540
cctacacct cccaggggc taaacctac tgggtctct cactctccc cggagcagt      600
tagagagtg gattgtgtc ctacagccc tgggtgtgt gactgccc ggggtacct      660
cctctctga ggaactggc tgttagggt ttctcttag cactttggt taccctcag      720
gagagtttc cccatttgt tctcttctc cagccaggt tactctcgg tctgtccc      780
taacacata cccgcgata tctcgttg agtccagt gtagctcag gtgtctctc      840
ctctccagg gaaaggggc cctgacacg caggcgggc tgcgtactc cgttttgg      900
gttgagggc agtgccgc tgtggcgt ctggccgc cccgcgcgc cgtctcttt      960
toctgagac tattgtcaa ggtttgtcc ctgagtagc ATTGGCTGG CAGGAGGAT      1020
CGAGGAGAA GTGGCTGATT ACTGAGCGGT TCTTCCTCAC CTGGCTTGG CCACGTGCA
CAGCTGTGC GCTGGCTGAG CCGCGCGCC TCGGCGCTC CCGCTGCTC TCGGCTGCC      1140
TACAGAGAGA TGTGTCCG TGGtgatg cgggacac tgggtccc agtctctgt      1200
tagtttggc gggagggag gtttgtga tgcctatcc gactgttg aggtgagt      1260
cgtctgagc ctgcccgtg cgttttccg gtccctatga acttccctt ccggcaggt      1320
gtgagacac cggctcact cgtctcttc tgcacctct ttacatttt cctctgac      1380
agtgtgata tgtctctcc attgcttcc taactcaga ctctgggctc ctgttttgc      1440
ctctctgta ggaatgtcc cctgtgtag ctacacac ctaacata gactcagag      1500
gacacccgc aagcctctc cactcagc caactctcc gactctccc actcagact      1560
ttgtctcct cttctttgt tcttctact tcccttccc ctgactatt cactcagag      1620
gtcgtgttg agctctatt atgacacag tctgtttta gatgtgta atactgagt      1680
gacacgac gactgtct ctgtctcag gaggcttca ttccgtgg aggttccag      1740
cggacacat aacacata attgtctat tgcattct cagagtatt ccgacgac      1800
tagacgctc tggccgggt tagtgttca cactgtgt ccagcactg tggaggtg      1860
aggcagagg attgtttag cccagaggt tgcacacg ctggcacta tagtgcac      1920
ctgtctctc aacacata aattagct gttgtgtg cactctctc gtgttccag      1980
```

[Drawing 2]

ctatagagag gataagagga gaggattgat ttagoataga aggtatagga ttagoataga	2040
gatatttga cootagoooa oagootagg ogaogagtg agootigtg toaanaaaa	2100
aaaaaanaa gaaatagaa oagootaga ttagoagag ttagoagag ttagoagag	2160
attatagat gaggagga gaggagga oagagagga ttagoagag gaggagga	2220
gaggagga gaggagga ttagoagag aggtatag aggtatag aggtatag	2280
gaggagga ttagoagag aggtatag ttagoagag aggtatag aggtatag	2340
oagagga gaggagga ttagoagag gaggagga gaggagga gaggagga	2400
aggtatag ttagoagag aggtatag aggtatag aggtatag aggtatag	2460
oagagga gaggagga gaggagga ttagoagag gaggagga gaggagga	2520
oagagga gaggagga ttagoagag aggtatag aggtatag aggtatag	2580
ttagoagag aggtatag gaggagga ttagoagag aggtatag aggtatag	2640
gaggagga gaggagga gaggagga oagagga oagagga oagagga	2700
taataana ttagoagag ttagoagag oagagga oagagga oagagga	2760
aggtatag oagagga oagagga oagagga oagagga oagagga	2820
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	2880
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	2940
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3000
aggtatag oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3060
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3120
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3180
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3240
aggtatag oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3300
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3360
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3420
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3480
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3540
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3600
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3660
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3720
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3780
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3840
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3900
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	3960

[Drawing 3]

ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga	4020
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4080
taataana ttagoagga ttagoagga oagagga oagagga oagagga	4140
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4200
ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga	4260
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4320
taataana gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4380
aggtatag gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4440
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4500
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4560
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4620
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4680
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4740
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4800
taataana ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga	4860
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4920
taataana gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	4980
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5040
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5100
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5160
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5220
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5280
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5340
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5400
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5460
ttagoagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5520
oagagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5580
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5640
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5700
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5760
taataana ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga ttagoagga	5820
gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5880
taataana gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga gaggagga	5940

[Drawing 4]

agctgctgc aacotgggt tcoitgggtc sagtattct cctgottcaa octocogagt	6000
agctgggatt acaggcgcc accacatgc ccagctantt ttttattt tttatagag	6060
aggggttto aocatgttg ccagatgtt ctgatctcc tgaotogtg atcggocagc	6120
ctgggctcc caaatgtgt gattacagg cgtgagocac tggocoggo caacttccg	6180
tttatcaaa caaatgaaa cagatcccg ctgagacaa agagccttcc ctgtacoota	6240
aaatttccc aqaattgtt cccagttagc atatttatt ttataaagt atgontgoc	6300
octoatata octtaaaaa gttatgtag gaacacagt totococag cccgtctct	6360
cagocacca gtttccctcc ctaggagag ccaacatat gtatttcta tctatccct	6420
gttagctgc ttttccctt ttgttttg ccgtgtgat gttgtattt ggaattacg	6480
gtaggacaa tcatatact tagttttag gacotctag atcacacag cctgacaaa	6540
tcagocatg taggacctt gtcccccag cccocaggag taggcccct gttgagtg	6600
ctggggcag gacaggcct aggcacaga attagaaag accatgttg acaggctgc	6660
tcaggctat gttgacat octotgccc agtggctg acacacatg tatgttgtt	6720
agaggaggg aoccttctt ctgtacaga ttggcaggt cttaactatt agtctctgc	6780
tcacatgca gacoccttg aacaggaggo tcttaactc tgttcttga agcctgagg	6840
gctgtgtat aggtttcaa agaatggtt ttgaaocg actgtctgg ttgaactct	6900
ggocctgag ctgactaat gctgacaa gcaatgct taactctct gacotcagg	6960
ttactgtct gtaaatgat aagatagcc cctgtttat aggtctgag tagaaccca	7020
atcacacag gcatgtgac gcatattag cacagcccc gcatccagc agtactact	7080
cgtgacagt tgtacccgc ataatgtta ttacgtggg caaggaggg ctgctaaa	7140
gcagctgtg gaggaggag agtggcgtt ggaocgtct gttgctatg ctgagtat	7200
tatctggcc tggagtgtc aaggacaaa tgttctcta ctgactgtt tgcacatat	7260
gtgaatgac atgctctga gacttgatt gaaagctgt ggaagtgag cccctctcc	7320
acccacagt ccaactgct ctgctctct tccctgtg tctctaaa cgaagatga	7380
aagtgaatt cccacaggz taggcccgc ctctctctt cccgccttg ccgctgccc	7440
caggcaATG GAGTGGAGC CCAGAACTG GAGGAGGCG GGTGATGAG GCGGCGGCG	7500
ACTGGAGCT GCATCTGAG CTTAGTCCG GAGCTCTCT CTTGGCAGA CTAGCTGAC	7560
CTCTGATTG CTTGCGGCG CTTCTCTCT GGAAGGCGG AGATGCTGA Gttagggcc	7620
tgcacccac gtagagagg aggcacagg gctgtgtgc caaggaaccc ctctaatgt	7680
cactgctgg ggcgcacag TGTTCACG GAGAGCTCA TGGCTGAT GAGAGAACG	7740
TGCTCAAGG CCGAGGTGT CACGTAGCT TCTGCTCG GCGCATGCG AAGAACGAG	7800
GTGACTTCT GCTCTCGCT AGtaggtg gcccaccca aocccagga ttttgccac	7860
tctctgtgc catocaggcc ctgacacat ccttctgtt toocctggc agtctgact	7920

[Drawing 5]

oocagtgtg toocgtgoc ocaacococa caotoccat coctgtctgt gccacoccat 7980
 gococtgtgt gocoocococ aggaactocg cogatocotg coctocogc totactocg 8040
 oacogactgg octocococg tgggtocotg cagggg9999 GATCAGGTGA CCAATATTGG 8100
 GATCAGAGAG TCAGGGGATT TCTATGACT GTATGAGAGG GAGAAATTTG CAGCTCTGAC 8160
 AGAGCTGTGT GAGTACTACA CTCAGACACA GGTGTCTGT CAGGACCGGG ACGGACCAT 8220
 CATCAGCTTC AAGTAOCOCG TGAAGTCTG CAGTCCACT ANTGAAGgt gagggtocg 8280
 caccococgc attcocaagc aggggtgagc cgggtocococ octgacacgc caggagagca 8340
 aggaactggc cagocggcgc tgcctacoc ccatcoccoc coctocctgc acbagctgg 8400
 gctocactg toocotococ ctgctgtoc aggaactgt gtctagagc ctacactac 8460
 aoccttoca octacococg aggaagcgc agaaactgc ctogcactac tocgagagc 8520
 ctggccctg caccocaggt cccctggag acagggagc cactgtgtgt ggcagactg 8580
 togtcagagc cagctgtgt gttagagagc totttctct ctggaactgc gctgacttc 8640
 ctogctgc ootocococ agocactgt aggaactgc ggaactgac ctggactga 8700
 gctggactg actgtgtgc agacactgt atgactgtc cagocococ ctggactg 8760
 ggtgtgtgt gggggtgac atgggtocg ggcocococ gactactgt aggaactgt 8820
 gtagactgt cactgtgtc aggtgtgc cgtgtocg ggcagactg actactocg 8880
 gacttactc octgtgtgt cccagactgc toctgtgtc toocagagc atggactg 8940
 agctggagc togtactgt octactgac cactgtgtc tttagagc cgtactgac 9000
 tgcagactc octactgac agggagagc gactactgt aggggttt cactgactc 9060
 octggagc ggcactgc octgtgtc gactactgc ttactgac ggtactgac 9120
 atgtactg actgtgtc tgcagactg cagactgtc gactactg cctocactc 9180
 gactactc ttgtgtgc agactgtc gactactg gactactg gactactg 9240
 agactgtc cccactgtc aggtgtgtc togtgtgtc gactactc agactgtc 9300
 togtgtgtc agactgtc gactactgc gactactgc octgtgtc cctocactc 9360
 cccactgtc caggtgtgt ttgtgtgc gactactgc agactgtc cctocactc 9420
 octgtgtc cccactgtc ggggagagc ctgagactg octgtgtc ggggagagc 9480
 cccactgtc agggagagc tgcagactg gactactgc gactactg agggagagc 9540
 agggagagc agggagagc gactactgc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 9600
 tgggagagc ttgtgtgc octgtgtc agactgtc cccactgtc ctggactgt 9660
 ggggagagc cctocactc aggtgtgtc gactactgc ctgtgtgtc agactgtc 9720
 togtgtgtc ttgtgtgc toctgtgtc gactactgc togtgtgtc agactgtc 9780
 ttgtgtgc actactgt cctgtgtc ggggagagc gactactgc cccactgtc 9840
 octgtgtc togtgtgc cccactgtc ggggagagc gactactgc ggggagagc 9900

[Drawing 6]

totggggtc togtgtgtc agtactgtc ggggagagc gactactgt agggagagc 9960
 ggtactgtc toctactgc cactactgtc ggggagagc ggggagagc toctactgtc 10020
 octgtgtc ggggagagc cactactgtc toctactgtc toctactgtc ggggagagc 10080
 ttgtgtgtc cactactgtc octgtgtc ggggagagc ggggagagc ttgtgtgtc 10140
 ggggagagc ggtgtgtc ggggagagc ggtgtgtc togtgtgtc cactactgtc 10200
 actactgtc ggggagagc octactgtc ggggagagc cactactgtc cactactgtc 10260
 cactactgtc cctactgtc ggggagagc ttgtgtgtc cctactgtc ggggagagc 10320
 togtgtgtc ttgtgtgtc ggtgtgtc toctactgtc cactactgtc ggggagagc 10380
 cctactgtc ggtgtgtc togtgtgtc togtgtgtc cactactgtc toctactgtc 10440
 ggtactgtc ttgtgtgtc toctactgtc attactgtc ttgtgtgtc togtgtgtc 10500
 cactactgtc cctactgtc ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 10560
 ctgggagagc ggggagagc ggggagagc cactactgtc ggggagagc ggggagagc 10620
 ggtactgtc ggtactgtc ggtactgtc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 10680
 ggtactgtc cactactgtc ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 10740
 ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 10800
 ggggagagc ttgtgtgtc cctactgtc ggtactgtc togtgtgtc cactactgtc 10860
 ctgggagagc cctactgtc cctactgtc togtgtgtc AGCATGCTCA CATGCTGCTC 10920
 GGGGAGGAG AGAGCTGCTC GAGGAGGAG GGGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG 10980
 AGCTGAGG AGCTGAGG CTGCTGCTC TGTGCTCA GTGAGGAG GAGGAGGAG 11040
 CAGGAGGAG GAGGAGGAG CAGGAGGAG AGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG 11100
 GGGGAGGAG cctactgtc ggtactgtc ggtactgtc ggtactgtc ggggagagc 11160
 cctactgtc ttgtgtgtc ggtactgtc cactactgtc ggggagagc cctactgtc 11220
 ggtactgtc ggtactgtc ggtactgtc TACGAGGAG GTGCTTGA GAGGAGGAG 11280
 AGCTGAGG AGCTGAGG GAGGAGGAG TGGAGGAG GAGGAGGAG GAGGAGGAG 11340
 TTTGCTAG TGGAGGAG cactactgtc cactactgtc toctactgtc cactactgtc 11400
 toctactgtc ggtactgtc ggtactgtc ggtactgtc ttgtgtgtc toctactgtc 11460
 agGCTACTA TGGAGGAG GTGAGGAG GTGAGGAG GAGGAGGAG TGGAGGAG 11520
 AGAGGAGG GAGGAGGAG GAGGAGGAG AGCTGCTC GTGAGGAG TTTGAGGAG 11580
 ggtactgtc cactactgtc ggggagagc ggggagagc ggggagagc ggggagagc 11640
 ggggagagc cactactgtc cactactgtc cactactgtc cactactgtc ggtactgtc 11700
 ggtactgtc togtgtgtc ggtactgtc ttgtgtgtc cactactgtc AGTTGAGG 11760
 AGGAGGAG GAGGAGGAG CAGGAGGAG TGGAGGAG GGGGAGGAG AAGGAGGAG 11820
 AGAGGAGG GAGGAGGAG CTGCTGCTC GGGGAGGAG ggggagagc cactactgtc 11880

[Drawing 7]

acagccctg	ccacagctg	ctccctcat	ctacaggtg	tcacccctc	acgacagag	11940
ggcctatc	ccacccccc	ccacagagc	tcacccctt	ccacagagc	tcacccctc	12000
ccagagctg	ctcccccac	ccacagagc	ggtgcccc	tgctccac	ctccctgga	12060
acccctcc	tcacccata	ccagctgac	ccacccctg	ctgcccacg	tcaccccca	12120
gcctctgga	ttctgagac	agagctgac	gttagctag	gaggtctga	ccagctgga	12180
gtgctcct	ggtaccccc	gacatctg	ctccctccc	gcacccccc	agttagccac	12240
AGCCGAGTA	TGCTGAGG	AGCGGACAG	AACATCCCG	GGTCGAGTA	GATGAATGC	12300
AACATACGA	AGTgagag	gtgcccc	gtgcccc	aggtgccc	ctggaatto	12360
ccgtctgtg	gggggcccc	tagctacag	gacagctgg	ccagccccc	gtgctctct	12420
tgctgctg	aggtgccc	gtgcccc	ctgtgctg	gcacccccc	tcacctctt	12480
gggtgctg	tcacccctg	gtgcccc	AGCCGAGTA	AGCCGAGTA	GAGGAGCTA	12540
AGAGCTAGC	CCGAGCCAG	GGTGTCTG	AGCCGAGTA	CAATGACTT	TGCGAGTGG	12600
CGTGGAGGA	GAACAGCGT	GTGATGCTA	TGAGCCCGG	AGAGGTGAG	AAAGCCCGG	12660
tgagccccc	cccttcccc	gcacccccc	ccgtctgtg	gtgctgccc	tgagctgga	12720
gagctgctg	gtgcccc	agagccccc	ctgcccc	aggtgccc	ctgtgtggg	12780
aacctgagg	ctgctgccc	gtgctgctg	acacccccc	cccccagct	ccctgctgg	12840
ctccctggg	tcctctgag	tcacccccc	gtgcccc	gtgctctct	ctccctccc	12900
ctgcccccc	gtgctgccc	gagccccc	ctgctcccc	tgccccctg	ctctctctg	12960
agctgcccc	tgacccccc	gtgcccc	ccacccccc	ctgtgctg	ccctgagct	13020
gacccccc	gtgcccc	gtgcccc	tcctctctt	tcgacccct	ctccctggg	13080
tcctgctg	ctgtgccc	agctgccc	ctgcccc	gcctgccc	tcctgctg	13140
tcctctgac	ccgacccct	ctgtgccc	ctgcccc	ccgacccc	agctctctt	13200
agctcccc	ccctctctg	ccacccccc	tcctctgga	gagctgccc	ctctccccc	13260
tcctctgga	tgagccccc	ctgtctctg	agacccccc	ggagccccc	ctctctctg	13320
gagccccc	ctgtctctg	ccacccccc	gagccccc	tcctctctt	ccacccccc	13380
tcctgagga	gtgctctcc	ccgtgccc	gtgctgga	gcctgccc	gcacccccc	13440
ccagctgga	tcctctctg	gtgctgga	ctgtgctg	tcacccccc	ccacccccc	13500
gcctgccc	gcacccccc	tcctctgga	agacccccc	gcctgccc	gcctgccc	13560
gcctcccc	ctgtgctg	tcctctgga	agacccccc	gcctgccc	ctctctgga	13620
agacccccc	tcctctgga	agacccccc	gcctgccc	gcctgccc	gcctgccc	13680
gcctgccc	gcacccccc	tcctctgga	agacccccc	gcctgccc	gcctgccc	13740
ccagAGGAA	TGCTGAGG	AGCGGACAG	AGCGGACAG	AGCGGACAG	AGCGGACAG	13800
CTCTGTGAC	AACGCGGG	AGCATGAGC	AACGGAATC	AACGCGGTA	CCTTAGAGG	13860

[Drawing 8]

CTCCGCGCTB BACAATgtga gtgccccca egcccccccc octtoogaga gtocotoot 13920
 ggcctgttgc toctototga togttaggg tgagtagat gagggtgtoc gagagagag 13980
 kagacactga cactatgtcc togttaggg GAGAGCTGAT TGGGAGATC TGGCATTACC 14040
 AGTAGCTGAB CTBGGCGGAC CATGGGCTGC CGAGTAABCC TGGGGGTGTC CTGAGGTTGC 14100
 TGGACAGAT CAACGAGGCG CAGGAAAGTC TGGCTCAGGC AGGGGCGATC ATGTCGACT 14160
 GCAGgtgagg gtgtatctcc tgatgtagt agtgacagct gaggagtaa tactgtatg 14220
 tgcctttago tgttatago actataacg ttatgtgca cattgtgtc octoogtca 14280
 oooooogott octoogtto octoatggo toagagaccc tgggtgato gtggtgaga 14340
 oagacccccc ttgggooto tgcctgtggg tatottoto agagacoot octgtgtac 14400
 actotogooo aacootgoca aatacagagg agggagccgg gacccagtg otggocaggo 14460
 oagagtagt caggagcagg caggagcagg aacccagta ggcctgtgc caggtgtc 14520
 cgtttctct caggtgtcca ttctgttgt ttctttccc aggaactct atgagatg 14580
 tgcctccat tectctctt ttctctcgg tggccaggg acttccgtt octotgact 14640
 ctgocctct toocagttc cccagcagt gcccctctt ggcocccag gctgtgag 14700
 gtaggtgtgt gctttttgg ggcagacat aactotgtt totatctcc agctgttg 14760
 tgcctagag aactgtgta aggtgagag gtgggggtg caggagag cagggttcc 14820
 aaggtgago oactgtgt ggcctggct ggtgtatga gaggcagtg gtgagggcc 14880
 octoogtta oactgtgt ggtgtgag aactatcta actttttat octoogtt 14940
 octotgtt aactagga totoggtt tgcctgaga ctactgaga octotgtt 15000
 gtgctgaga ttctgttgc octoagac ttgggtgtt tactgtta gtaactca 15060
 toagagag actagggga tgggaactg octtgcacg gtaactccc actoactg 15120
 tggcccccg ggcctgagc ggcctgtgt toctctctt oocccagc cgtgtgtc 15180
 tggcccccg caggtgtgt aactatga gtgccccga tgggtgtc agggagcgg 15240
 otgtgtctg tgcctctca gggagggcc octoocagc agtaactc otgocaccc 15300
 ggcacacac octoocac octotgtga ggcocccgg octtttttg agttacag 15360
 agggagtg gttagggg ttatttttg aactgtgt ttgaactg acagcagc 15420
 tggagctc agctgttg gctagctga ggtgtgtt ggtgttcc tgggtgtt 15480
 ttggccccc ctagggag agagacact cctactgag tgcctctg agtccctga 15540
 cactgtcc cagccact cgtctcag gctactctt octtgcag aggtttga 15600
 gggagggga agtaggca tgcctgaga cctactga octtgcag gaggaggg 15660
 gggagggga gtagctgg agccaggg agaggttg gtttgggg toocaggtt 15720
 tocgaggg gggagggc tgcctgag tggaggtg ggcagggg tggagggg 15780
 aggtgttg gggagggg agccaggt agccaggg agccaggg ggcaggtt 15840

[Drawing 9]

catgagag tggcagac toactctca ctgcccgt ggcctgggc aactctctc 15900
 octoactgg aggtcagc tgcctgtg gtgctggg ctaggctga gctgtgta 15960
 oooooctcc ggggaggg ttgactgoc totgtgga oooooctt toocaggg 16020
 CGGCTGCGC GGCACAGCA CGATGATT CTATGAGAT CTGATGAGA AGATGAC 16080
 CAAGgttag gggacactg ggtttggg gggggggg aggggocct oggttggc 16140
 ctgtgctgg aactgtgt tgcctgccc oacccagc CTGACTGTG ACATTGACAT 16200
 CGAGAGAGC ATCGAGTGG TCGGGCGCA GCGCTGCGC ATGTCGAGA CGAGAGCGA 16260
 GTACAGTTC ATCTAGTGG CGATCGCGA GTTGATTAA AGCACTAGA AGAAGCTGA 16320
 GTCTCTGAG gtgctgag agcaggtct gggggggg gggggggg tgcaggtg 16380
 gtgcccctg ggcctgtgg ggcacccc ttocactgt octotgccc acagTGCAG 16440
 AAGGGCAGG AGTGGAGTA CGGAGATC AGCTATGCC CAGCCATGA GAATGCCAT 16500
 GCGAAGGCT CGGCGCTC GTCCAGtg gtgcccga ctgcccga cgggctca 16560
 oocttgtc ctgcccga cgtactca ttctggga ggcagagt tgcaggtg 16620
 gggagctga tgcagttc ggttgttc toocccctt tttcttag cattctga 16680
 gtgcccga gtgtggtt ctgtgtga oagcagga octgtgtt ggtgtgag 16740
 ctgttctc tggaggtg ggtgtgtg caggagcgt ggtgtgta octgtgag 16800
 ggggtgga gggggagt aggtgggg ggcocctgt ggtgtgtt ggcctgccc 16860
 aactgctg acttgcac ctgcccga ctgagCAC AAGGAGATG TGTATGAGA 16920
 CTGCACT AGAGAGGA AGGAGAGGA AGTAAAGGA CAGGCTCAG CAGAGAGGA 16980
 GAGAGAGAG GGTTCCTCA AGAGAGGTG AGGCTGCTG TGTCAAGTG GCGATgtc 17040
 agctctct cgtgtgtc octoogcc tgcctgtgt octgtgtc actgtgtc 17100
 ctgtgtgt ggtgtgag cagctactt ctgtgtcc caggtgtc agacactt 17160
 gtgcaccc caggttcc octoogcc octoactca toactctt tggcagCTC 17220
 AGCCCTGAC CTGTGAGG ATTTGCGAT GACAGACTC AGAACCTGA CTAAGAGTG 17280
 GCGCATCTT TTGTAATTA AATGCTGCA TCGCCCGAC CTCTCCCTG CCGTBTAT 17340
 AGCCAGGCA GCGCCGAGC AGGCGAAC CTCTCTCTT TGTAAATAA GCGCTGAGT 17400
 CACTgtgt ggcctgtg ccttgtgt ggcagtg tggcagga ggggaggg 17460
 caggtgtgt aactgtgt ggcctgtg gtgctgag tggagctcc ggcctgtg 17520
 agagaggt ggtgtgag toocctgc aggtgtg gtgagctg gtcagctc 17580
 cagctctt tottttat gggaggtg actaacgg tgttgtga aggcaggg 17640
 gtgaggtg aggtagag ggcagagt actactca octgtgtc gtgcccag 17700
 actaacag toocaggt agtgtgt aggcactt gctctctc ttttactg 17760
 ggcagctg ggcagagc aactagta actgtgta ttgcccag toocaggt 17820

[Drawing 10]

ntggacart gaggctgga ttgaccca ggtgtctga cccagagcc oacactcett	17880
moontgagt tgcagctgg gccacccca gggggccot gatcacctc oactgtct	17940
gatttccga ttgaccta gaggatagt taacagcgg agagccagc ctgaggccag	18000
cccgctgag tccctctg cgggacagg gacaggctcc tcaaggccc cgggacagc	18060
cagctccac cctccatag gccctgctg cctttatct attggcaga gtttgaag	18120
ctgctgagc tgaagatgc tttgttttt gtcctctct cttccccc cgtcaggat	18180
gggtttctt ctttattga aacactgag tctggggag taagagcgg gggagtcac	18240
cctcaggag tctgagccc cactctgga aggtctgga cagcaggt cccacagccc	18300
agagctggg cgtgactac tcaaacact cttacagag ccccgctga aagagctta	18360
acgtccccc gactcctg accttggg gctgctagg gaga	18404

[Drawing 11]

tctccctac cagctccta attccagg gtcggggg ctgtactc ctgtacccc	60
ggagctctg taaggattg ctgactatg cagccccc ctgtgctt tgggactgt	120
gctgtctag cctttccag attggggcc agcacttct gaggatgac tcccacggc	180
tttactccc aggacccag ttttccatc aaggagaca cccactcct gactggggg	240
aaggagagg ggaacacaa caagcactc ttccagtcg cagctcttc aacatcgcc	300
caagagata agggagcag cggctggtg gagggggga gttgggtg cccggtgt	360
ctgaggagc tctccctgt cccgcccag gggggcagg cgggtgccc taaggctgc	420
gcttcaggt gttactact cttcttatt cagctctga actcagctc agggaggtg	480
gctcagccc cccctgggg tggccccc tgcactcca ggttaaggg tgggctct	540
gggtcagcc agctgggtt cagtcacag cctccctgt cctcagcct gtcacttgg	600
gcaagtcac aagtactta gttttctg cctccattt cccgcccgt aacatgaga	660
tgaagaggt gactagctg aactaacgt tctgtcttt tctgcttgg gcaactggc	720
agctgtgtg gactcctgt gccccttta tctcagcgg tctctcgtt gttttccca	780
cccccctgt tctgctgac ctcctttta aaggaggga ctgggagct tcccccagg	840
tcccccctc cctgagagg cggagtcac ccccccctc gctgagga agggagct	900
ttccagcag gacagcagg agggacccc agttccccc cctgcccgc cctctggcg	960
ccactcact gggacagca aggtctcag tgcacacac ATGATGCCA GGGCTTTAT	1020
TACAAGAGA GAAGGTTGG CCTGCTGG GGCCTGCTG GCTATATAC AGGTCAGGG	1080
AGAGTGGGG GGGATGAGC GATTAAAT ACAAAAGAT GGGGACTCC TAGGTCAGG	1140
TTGTAGTGT GTCCATCGG AATGCTTC ACAGGTCAG GCTGAGGct gccagagaa	1200
gggctggg gactgagg gtagctgga cctggagtg gacacaggg gctggggca	1260
gtgggagc acagatgag gctggggcc cccctccac ccaggaggg cagtggagc	1320
agggacacg gggggcag ggggacccc cgggacagg agctgtacCA TGGGCACTG	1380
AGGAGAGCA CACTGCTTC CTCTGAGGG AACCTTCT CTCTCTCTG TCTGCTGAC	1440
CTCTCTCTT CACTTTCTC TCCCTCTGT TCTTATGTT CAGGTTCTGA TACATCTCT	1500
CTTGTGTct gacgcccgt gacgggggg aagtacagg agttgtgca gctcaggga	1560
cagacacgg ggaacggca ctggagctc cctctggcc cccctctca cagtggagc	1620
agccagctc cctgactag actccagct cctagagga agagctaca tctctacac	1680
gagtggctg ctgtacta gacaggccc aacgttgg gactcagga aagtattatg	1740
acagagagg gtagaccca agctgaact tgaagccag tcccccagc tgcacactt	1800
gtctctccc gaaagtggg atgggctgg gaggagaaa ggggtggtg cgggaggtg	1860
gagtcaggg cactccatt GGAAGAGTG CAGGAGGCT TGGATGGGC ATTCTCATG	1920
GCTGGGGAT AGGTGATTT GGGTACTCC GACTCTGGC CTTCTGCA cttagggag	1980

[Drawing 12]

agggagagtg gggaggtgt ggttccagaa gggcagatg gcacccatcc tgcactgag 2040
 ooooooocoo oooooogooo tgcctgnao gaoctgcah gacctgcabc ttcttttag 2100
 tggtttcaat gaaactggcgc atggcacaht agatgaactt gtactgcgcc tccgtctgca 2160
 ccatgcocga gggctggccc cgcacatgt gcatgtcttt ctggatgca atgtcacat 2220
 ccahccctgg gtgggggaa gtcaaacoto agtccaggo ataggagac acagagggc 2280
 tgcctaccc ocaoooooa accooooagt gooooctac cttggtagag atgtttgca 2340
 tgacacatgc gatgacaatg atggtgcctg tgcacccat ggcggcgctg gggagagag 2400
 gggctgcat cagagcagc toagcctoto oooooagag gggtaacca ggcctagct 2460
 cagacccag goooooagg agcagctga gctccagtg atggagaga atgtgucag 2520
 ggtacccgg caggtgtga tggagttg cccagctgt cgtggacag ctccacotg 2580
 ggtctggg tgcctagct ggtccacag ctgcccact ccttccctc tccctctc 2640
 ggcgcactc ctactacta gtgagtggt gcccacccc cggagacat gggacccaa 2700
 atccaccca ctgtctgco ggtccagag tccctgaga cttccccc cttccctga 2760
 agatctatg agctctctc agctgtgtt cccctccct ttcttcaaa cctgagctc 2820
 agggagagga tagcctgag acagagggg ggggggagc aggttcagg gactagagg 2880
 agcctgtcag tagaggtt ctctctctt cccagctgg gaaacagac ctaaggaga 2940
 cccagggccc accctcagc ggcacagca agctgtgco ctggctggc ctgtctaat 3000
 toaacccag atgttcaaa ctacccccc accccactt ccttctgta agctctaat 3060
 aaggccctg ggtcttcaa gaagtgtg atgtgtg tggaggtg cagaggggt 3120
 agctctgg gatggctg tccctgag agcagagac agagccctg cccggagag 3180
 cccctgggg gacactag attcagcga ctgcccgtt cccagagaa acagctgtg 3240
 gggagaggg agggagcag aggcctgag aggcctggg tccagagag gaggtagag 3300
 ggaacgggg agggaggtt cccctcccc tattctgga ctgtgtg ttaataat 3360
 agtaacagc cccgttttt gaggctgaa ggaatccag cccacagat aggtctaat 3420
 tggcttcca gacacccct gactctga tttaagat gaggagctg aggttaga 3480
 aggttaga atgttcaa gacacacag ctgttagag gaggagcct gacacacag 3540
 cctctctcc accagggga ggcagctga ctggctgac ctgttaga cctgtctc 3600
 ctgcagccc cccctctgc accctacag aggtctctg atcacacaa tgcggtaga 3660
 tagacagag agttatgag agccacag agcctaccc cttccccc cagccctgg 3720
 ggcagagag ggcagctgc tggagagct gggagagag gaggagag gaggagag 3780
 aggcctgag gctacagag gacacagag aggaatggg agacacccc tctgtgtg 3840
 tctgtgga agacacccc agaatggga ctgagagaa agggagag cgggagaca 3900
 agctactgt ggtgctgag cggcctgag cctgagag tggagctg cagagagct 3960

[Drawing 13]

ggtccggg tccctctg tattggag gttgggga gttgtact cggagagag 4020
 ctctgagag gtaacccaa gggagggg cagggtggg ctgttccag cccagatca 4080
 cccaggtto tggagcctg agggaccca gggagagag gggtagag gaggagcct 4140
 atgtgagag ctacgttta tattgttat accagctat ggccttagc agttattat 4200
 tctcagct cactactac atcagatta tctcttcaa ctgacatga ccatatggg 4260
 cctgacatga ggcacacatt ctgacacat gttgacatg tccagagag tgacacac 4320
 cccagacatga ctgacacac cagatgacag cagacacag tactgttat ggcacatgc 4380
 cccagacag tctgacag cagagagat aggttagg cccctctct tctgacaa 4440
 cctctctat ctaacacaa cagacagag agggagaaa gtcagggg gactccag 4500
 atgtggag ggtgtggg cccctcatt tttccacag gacacacat aagttacga 4560
 gtttttatg gtttttatg tctgacag agttgtac agataggg ccatagac 4620
 gctgacatg cactgagag cactatgga cgcattgtt ctggagag aggttagg 4680
 gggagagag cccagagag ggcagtgga cccctccag gttctctct gtttttag 4740
 tgcctgag cggccacac attgttga tggagagag ggtgtgag gaggagag 4800
 accgtgct tctctcag tccacacaa accgtgtg aggtctgag agccactca 4860
 cgggtacat cgtttgat tccacacag ttgagagag aggtctgag cccagagtg 4920
 tgcacacaa accgttcaa agacacat accacacat ctgtgacat gttctgag 4980
 gactacag agcagtgga cgggggga cccagctg aggtgtg ctggagag 5040
 gttattct cctgtgag ctggagag caggagag gttccagag gaggagag 5100
 tccgtgtg ttttcaaa cggagatct ggcagagag gttgtgtg agagagat 5160
 tctctgag aaatgagct tctgagag aggtgtg accgtgag gttgtgtg 5220
 ctgggggag tggactca agagagag ggggtgga gggagagag cagacatga 5280
 atgagagag ttgagtgag actttatcc aaagttag aggtgagat gaggagatt 5340
 agagagag ggaactgag cagtttgt tccagagag gttccacta gttgagag 5400
 agagagag gttgtgtg aggtgtg gttgtgga gttgtgga gttgtgtg 5460
 gggagagag agagagag cgtgtgga gggagagag gggagagag gaggagag 5520
 gggagagag agagagag tggagagag agagagag ggtgtgag aggtgtg 5580
 ggtgtgag gttgtgga gttgtgga ctgagagag gttgtgag gaggagag 5640
 cccacacaa tggagagat tttgtgag ggtgtgag gttgtgag tttgtgag 5700
 ggcacagag agagagag gttgtgga gggagagag gggagagag gttgtgag 5760
 ctgtgagag gttgtgga tggagagag gttgtgga cagacacat ggcagagag 5820
 atgtgagag ggtgtgga aggtgtg ggtgtgga gttgtgga gttgtgga 5880
 ggtgtgga ggtgtgga ggtgtgga ggtgtgga ggtgtgga ggtgtgga 5940

[Drawing 14]

tgcccccga caggccctga accactgca cccctaccca tgcagagagc agcttcggc	6000
tttgccacga tgtctctgga totagggtcc ccccccacga cagggaaito ccagggcacc	6060
gcctctctcc cccagtggcc cccactgctg acCTTgATGT AGTTGcATT GATGTAGTGG	6120
GACCCGCGGA TGTTACTGTC CCGTCCCTGC AGGATCACTC GGCCTGTGTC AActggagct	6180
gggvgagagc gaggcgagct ggtctgggtt agccaggagc tcccacccc tgggtcagac	6240
ccctctgagc taccagccca ttctggctcc agagagccct aggtttggc gggactgtg	6300
gcagccaggg tggggctca totgtatgga gggagtggc ggttccaca ggggttggc	6360
agcagggggc accctgctg ctggtgtggc gggagccct ctggggagc tagaggctt	6420
ttggagagc gggagctct gtagggctg tggagagc gccctctg ggtggggc	6480
tggagccct tggagtggc gggagagct agggagggc cgttatctg ggtgagtg	6540
gcagccaggg tgcacagc GAGAAATGTT CTGTAGCG TTCTTGCCT TGTCTCTGG	6600
CCGCTGCGCT TCGACGCT GGTCAAGTT CTTCACCTCC TGGTCTGCA AACTctgga	6660
tgtggctggc gactgagc tccctccca agaggagct cactggggc agctccagc	6720
gggtggctca gggagaggg tgggagggc agggagggc tccgctggc gccccagggc	6780
gctgcaccca cctcagctg cccagccctg cgggtccca cactgacCT CAAGCTCTC	6840
CCAGAGCCCA GGCCTGCTG TATGCTCGA CTGCTGCTC TTGTTCAATT CCAAGACTGG	6900
GTTCCTCAATG TCGCCGCTAT TACGCTGCT GGCATATAC GGTggctg gggagagc	6960
agagtcagc actccagga tccagagc tccactctg gggagagc agggagggc	7020
ggggagagc tgggcaccc cctgacCTGC GCGAGGTAGA CAAGAGCGGC TGAGGCTGC	7080
TGAATCCCGG TGTCTTGAA ATGCTCCAGC AGGTCCGTGA GGTGTGCAA GGTGTCCAAA	7140
CGACCCAGTG TGTAGCTGC AGGctggc gggccactt agggcctta caggcttga	7200
gtctccctcc ctgggtcccc agcttgact tccagccagc gggagcctc cctgcaccc	7260
acactgtgt cccagaggg agctccagc ggggtcccc agggccctg ctgcttacc	7320
TGCAACATGA CTTTATGTR GGTACCCCTG AGCGGGGAGC CTGGGCGAGC CTTGGCTGG	7380
TGACTBAGCA CAGAAAGCAG GAATCTCCA GGTGCGTGA GGTCTCGAGC CACAAGAAAC	7440
GTGAGAGCT CCGCCTTGGC CTGACAGAGC GTCTCTGCT GCGCGCGAGA CATGTGGCA	7500
TGCTACCAAC tagagaggg aggtcaggg aggtcagc ccaggcccca ggggagggc	7560
ctgagagag acattccagc agggggggc gggctcagc actactgtg tggcagggc	7620
tggctacat gttccactt cccacccctc atttaggtt ctacacacac tggtagagc	7680
taggtatgat attaccccca ttttatgat ggggagctg agctgagct gttactact	7740
ggctcagggc ccttgaatga ctctaggga agcttcaggc gctctgttc ccagctggc	7800
gtcagctggc ggggttccag ctctctggc cctcagcct ccagggttca gccctctag	7860
cctccagagt totacaggg ctctggagcc agggccccc tctgagagc agagagctg	7920

[Drawing 15]

aaatatttaa	aaatattg	agagagag	ctaaagta	atctaatga	agagagag	7980
tgtttttaa	agagagag	agagagag	aaacagag	ctagagag	aaacagag	8040
tgtttttaa	tgtttttaa	gaatagag	aaacagag	agagagag	agagagag	8100
agagagag	agagagag	aaacagag	aaacagag	agagagag	agagagag	8160
ctagagag	aaatagag	agagagag	gttaagag	atttagag	gtttagag	8220
aaacagag	aaatagag	tttaagag	aaacagag	tttaagag	aaacagag	8280
aaacagag	aaacagag	aaacagag	aaacagag	aaacagag	aaacagag	8340
aaacagag	aaacagag	gtttagag	tttaagag	aaacagag	aaacagag	8400
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8460
tttaagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8520
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8580
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8640
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8700
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8760
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8820
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8880
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	8940
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9000
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9060
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9120
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9180
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9240
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9300
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9360
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9420
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9480
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9540
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9600
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9660
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9720
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9780
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9840
aaacagag	aaacagag	gtttagag	gtttagag	aaacagag	aaacagag	9900

[Drawing 16]

agagcagat	ttoitgat	tootagagat	taagttaga	agagtagg	ttagctotg	9960
agacacagg	toocagaga	gagagagga	ggagcatga	gagacacag	taagttagt	10020
agggagaga	atggagga	ggagagag	gagcagag	toactgcto	tootgatgt	10080
agagtagga	gagatgat	oatgtgat	gagtagagga	gagtagagga	oatgatCT	10140
CACTAGTGG	ATGAGACAG	TTCAGCGAT	ACTTAGAGT	GATGATGAT	CGATGCGGT	10200
CTGTCAGAG	ACCGTCTGCT	TGAGTGTAT	ATCTGACAG	CTGTGTGAG	GTGCAAACT	10260
TCTGCGCTG	ATACAGGTG	TAGAATCG	CTAGCTTG	GATCGAAT	TAGTCACT	10320
GATCGCGAG	CTggagagc	oacagaggt	ggagcaggt	gagtagag	ggagtagag	10380
agggcagga	tgggtgat	tootgtgag	ggagacacat	ggagtaggt	ggagacacg	10440
agggtaggg	agtgtaggg	ttaggggga	ggagacagc	ggagtagtg	oactgacag	10500
ggagacagc	agagtaggt	taagtaggt	gagtagcag	agagtagag	agagtagag	10560
ggagtaggg	ggagacacat	actTAGAG	GAGAGAGAG	TGACCGTAG	TCTTGAGCT	10620
gggCGAGCG	AGGAGAGCT	CGTAGACAC	TGGCGCTTG	AGCAGAGCT	CTGATGAG	10680
CGACTGAG	TGCGCTGAA	ACCACTggg	ggagcaggg	agggtaggg	ggaggggtg	10740
cgagtagag	agagcaggt	ctgcctgtg	taagctgtgt	ggagagcgt	taoCTAGCA	10800
TGCTGGGCG	TTCGAGAGG	GAGGGGGGG	CAGGGAATG	GGAGGTGAG	CTAGTCTGG	10860
GAGGACAGA	CGTCAAGGAG	TAAAGCTAG	ATGAGCTGC	GAGTGCGGG	CGCGTTCAG	10920
ACCGCGGTT	GTCCCAATG	TGGGCTGCG	ACTCACTgg	oatggagag	oagggagag	10980
agggagagc	agggcaggt	oagacacct	ggagagcag	acttagctgt	ctgttttag	11040
agacacagc	ggagagagga	ggagagagc	gttagcaggt	ggagagagc	ggagacacat	11100
toacacacat	ctgacatga	aggttagga	gagtaggatt	gacacatgt	gacacacat	11160
agagtagga	agcactgtg	oatggagag	toagggaga	gagtagatt	oagcagtag	11220
agacacagc	gtacacagc	ctctctcct	oatcagag	ctgttttag	ggagcctac	11280
ctggacagc	ctatagaga	ttaggtggt	gacacatgt	atagagtag	tootgtgag	11340
tgcaggggc	tggtgtata	tgggttga	ctagtgtg	ttagttgtt	ctacacag	11400
oatgtgag	agagtagatt	cttatatt	ttacagaga	ggagcaggt	gttagcag	11460
tttaggcat	tgcctgagt	catcagtag	taagtgag	tgagagatt	caacacacag	11520
catcagatt	agacacagc	tggttaga	toatcagac	agacacatg	gagtagag	11580
acagagatt	agagagaga	tgttcagag	ggagtaggt	ggagagaga	ggagtagag	11640
taagcattg	caagctgtg	cagagagga	gggtgcctc	ctctacaga	catatgagt	11700
tgtcctat	caatgtgag	gaggtgga	caactgac	ctgacagc	ctgtacacat	11760
gggtctttt	taatttgtt	oatagagat	ctgacatgc	oagcagctg	oagcagggg	11820
ctctatctg	ggaggtggg	ggagagagc	ctacacatg	ctgttatct	oagcaggtg	11880

[Drawing 17]

tgatettaga ggcotnaao actaaggat atgatgtgo ctacotgtan ttocaaatoc	11940
aaacatocao aocogocaoa caaaacagag aaagcagot caacaggaga taocatagaa	12000
aaacatatgt gtgatttoco ctaggagagg aaactagggt gctaggagao aggtotggg	12060
gagacactgt gttototaoa taacttttg aatgttatat gttggootg ootiaacttt	12120
ataaaataa atagtctac tgggaacat ttctaggaa cttttagggt aacggagag	12180
ctctttgtot ctatctggat gttgtttga tgggtgtga taacotgtan gtggocagg	12240
cgcagtgtot cagcactga atcocaagca ttggagggo caggotggc ggtatocag	12300
gtocaggagt agagacooto atggocaoaa tgggtaaoc ootototao taanaataa	12360
aaaaattag atgggootgt tgggtggggo atgtaatoco agotactgg gaggtagag	12420
caggagato acttgaaoc aggaagocga ggttgagag agocagato aococactgo	12480
actocagoot ggaocaaag taagatota tttaaaaaa aaaaaaaaa tggagocagg	12540
ttgtgtott aatatttatg aacattatgo atgtctgtct tcaagtaaaa gaagaaagag	12600
ttttaagoc aaacagtota attttccat gataactaa ttatctttt tagaaacato	12660
aaacatcaat gttttccoc aaaaaggct tttaacttt tottttttto tttttgtot	12720
attgtttot ggtttttto tctaatgtgt gcotaggga atotgctgg tgggtttat	12780
gactgtocg gotttgaota ooottttago ttggacocaa oocagagao ooggaaatoc	12840
ggggaocoo cagococaoa gaaaggago aagaaagaa catgocaggo tgggtcago	12900
ggggaocao ogutggotct ctogotooto toggagtgt caggatocag tgoatgoot	12960
gaaotcagc aagtgttca caaaocagot ogtaatocaa tagcacaata cctggocaca	13020
agtaagott ootgttota caaococago ctguttgta taagaaagaa aggggocaa	13080
oacagtocaa gaaocacaa ctatctatoo atgtocact aocacatac ctgtocagt	13140
gaaatocoo agaatggaa caaaatctg aococaaag aagttaagg tootgtota	13200
gaacaaagc oocootgao ootggococaa agaaatoot tocaggott aaococact	13260
atggagagg aattaatog gaaocaaagaa gaaatcaat agaaocotot tootgocaa	13320
tggagagggo agaattoot atgaagggt taagocaaag agacagaact cagaaagag	13380
gtacagotto tgotatcct tggagagaa ataaaaact aotocotta ccttgootg	13440
gtgtgggtt tgcagatcac tttaacatac agatctaat ttaggootaa gaaagocotg	13500
tgtgtagga atcattttc caattttct atggagagaa aocagotag ggaatuaag	13560
aattacaga gtaatgact gataattag aaaaaaaan tatitcottg gaagcagaa	13620
gataaagta gatagcagg caggagcag tggotcagc atgtatocc agcatttgt	13680
gggttagg ctgtgtatt aottgacac aatttgaga gcagcctagg aaacttgag	13740
aaactgtto totacaaan atacaantt tagaaagtg tggtagocaa oootgtago	13800
oocagtact tggagactg agatggagg atogettgag ootgggtg tagagotgo	13860

[Drawing 18]

[Drawing 20]

```

XXXXXXXXXX ctaagtaga gtttagccct XXXXXXXX taggcccagc caggaaccata 17880
XXXXXXXXXX gttcagggg stggagcctg gaagggcaga gggagtcagg gaaggaagaga 17940
tggggttgt caggttagca agagactgac mcccagctca agtcacagga gcttttatta 18000
ttgtatggaa cgttagggcc ttctotatcc tggcagtgga acaagggagg gcaaatcttc 18060
aggaagagga cagctgaca caggaagag ggcctatggz tggcaggttc atggagagca 18120
gaagcagcga ctttagcttg cctgaagggg tggcagcttc agaatctgg gcttcgtagg 18180
aattgaacca gagagaaao ttaaggacaa ctggaagagg gattggaagg taaacccotto 18240
tcttagagac cagctgact aggaacctg gggggctgg tagcttago atgaactgt 18300
ccccccctg ctggcagct gtttgcaaa caggaagact ggaagctct gtccctgtg 18360
gtttgagga tgacattgg tcttagctg gcaagactag atgg 18404

```

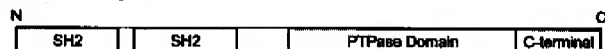
[Drawing 21]

```

ATGCTGTCC GTGGTGGT TCACGAGAG CTCAGTGGC TGGATGAGA GACCTGCTC 80
AAGGGGAGG GTGTGAGG TACTTCTG GCTGGGCCA GTGCAAGAA CGAGGTGAC 120
TTCTGCTCT CGTCAAGGT GAGGATCAG GTGACGATA TTGATGAGA GAACTAGGG 180
GATTGTATG ACGTGTATG AGGGAGAGG TTTGGAGTC TGACAGAGCT GGTGGAGTAC 240
TACACTCAG AGCAGGTGT CGTGAGGAG GCGAGGGGA GATGATGCA CCTCAAGTAC 300
CGCTGAACG GCTCGATCC CACTAGTGA AGTGTGATC ATGCGCAGAT GTCTGGGCGG 360
CAGGAGAGA GCTGCTGCA GCGCAAGGG GAGGCTGGA GCTTTCTGT GGTGAGAGC 420
CTGAGCAGG CTGAGAGCT CBTGCTTCT GTGTGAGTG ACCAGCCAA GGTGGGCCA 480
GGCTCCCGC TCAGGTGAC CCACATCAAG GTCATGTGC AGGTGGAGC CTACAGAGT 540
GGTGGTTTG AGAGCTTGA CAGCTCAGG GACCTGTAG AGCATTTCA GAAGAGGGG 600
ATTGAGAGG CCTCAGGCG GTTTGTCTC CTGGGGCAG CBTACTATG CAGGAGGTG 660
AATGGGCTG ACATTGAGA CGAGTGTG GAATGAACA AGAAGCAGG GTCCGAGAT 720
ACAGGAGAG CTGGCTCTG GAGGAGTTT GAGATTTTC AGAAGCAGA GGTGAAGAG 780
TTGCACAGC GTCTGAGG GAGGCGGCA GAGAGAGG GAGAGAGCG CTACAGAGG 840
ATTCTCCCT TTGACGAG CGAGTGTAT CTGAGGAGC GAGAGATTA CATGCCGCG 900
TCGACTACA TCAATGCCA CTACATCAAG AACGAGTGC TAGGCTGTA TGAGAGGCT 960
AAGACTACA TGCGAGCCA GGTGTGTGT GAGGAGAGG TCAATGACT CTGGCAGAT 1020
GCTGGCAGG AGAAGAGCG GTTCATGTC ATGAGGAGC GAGAGTGA GAAAGGCGG 1080
AACAAATCG TCCATAGT GCGGAGGTG GGCATGAGC GTGCTATGG GCGTACTCT 1140
GTGACCACT GCGGAGGCA TGACAGAGC GAATACAGG TCGTACTCT ACAGGTCTC 1200
CGCTGGACA ATGAGAGCT GATTGGAG ATCTGCAAT ACCAGTACT GAGTGGCC 1260
GACCATGGG TCCAGTGA GCTGGGGT GTCTCAGCT TCTGGAGCA GATCAAGAG 1320
CGCAGAGAA GTCTGCTCA GCGAGGCGC ATCATGTGC ACTGAGAGC GCGATGAGC 1380
CGCAGAGCA GATCATTTT GATGAGATG CTGATGAGA ACATCTGAC CAGGGGCTG 1440
GACTGTACA TTGATCCA GAGAGGATC GAGATGTGC GCGGAGAGC GTGGGAGT 1500
GTGAGAGAG AGGCGAGTA CAAGTTCATC TAGGTGGCA TCGGCAATT CATTGAAGC 1560
ACTAAGAGA AGCTGAGGT CCGAGTGC CAGAGGGCC AGGATGAGA GTACGGAGC 1620
ATGACTATC CGCGAGCAT GAGATGCG CATGGAGG GCTGGGAGC CTGTGCHAA 1680
CACAAGAGG ATGTGTATG GAGCTGAGC ACTAAGAGA AGAGGAGGA GAAAGTGAAG 1740
AAGCAGGCT CAGCAGACA GAGAGAGAG AAGGTTCC TCAAGAGAA GTGA 1794

```

[Drawing 22]



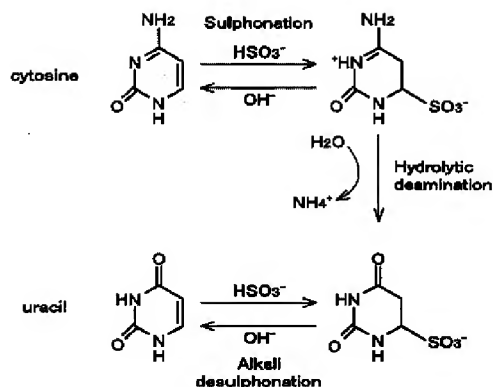
[Drawing 23]

MVRWFHRDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPSRKNQGDLSVVRVGDQVTHIRIQNSG
 DFYDLYGGKEFATLTELVEYTTQQQVLQDRDGTIIHLKYPLNCSDPTSERWYHGHMSG
 GQAETLLQAKGEPWTFVLRESLSQPGDFVLSVSDQPKAGPGSPLRVTHIKVMCEGGRY
 TVGQLETDFSLDLVEHFKKTGIEEASGAFVYLRQPYATRVNAADIENRVLELNKKQESE
 DTAKAGFWEEFESLQKQEVKNLHQRLLEGQRPENKGNRYKNILFPDHSRVILQGRDSNI
 PGSDYINANYIKNQLLGPDENAKTYIASQGCLEATVNDFWQMAWQENSRRVIVMTTREV
 KGRNKCVPYWPEVGMQRAYGPYSVTNCGEHDTEYKLRTLQVSPLDNGDLIREWHYQ
 YLSWPDHGVPEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIVHCSAGIGRTGTIIVIDLMLMENIST
 KGLDCDIDIKTIQMVRQRSGMVCTEAQYKFYVAIAQFIETTKKKLEVLSQKQGESEY
 GNITYPPAMKNAHAKASRTSSKHKEDVYENLHTKNKREEVKVKQRSADKEKSKGSLKRK

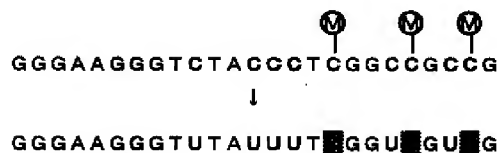
[Drawing 24]

actocstott	gacgtgtoc	ttaagttag	tcttggtc	agtcotc	aaagocagg	240
toctagat	ccagootgt	caggacag	gaagctg	tttctgc	ccatgaocot	300
gocacocot	ggcctgtg	ctggtggoc	ctgtgc	cc	toctagagt	360
ttgtccot	gocagggag	gaagagoot	gatgtocag	acatataa	atgctgt	420
gaottagoot	tggttagt	ctcttga	ccagacac	ccatctctc	cttccotgt	480
toctctgoc	tttccagg	ccatccocot	gaacagotc	toctctagt	ccgtgtgg	540
ccatccotg	ccocaggoc	taacccotc	tgaggtoc	ccctccoc	ccagaggt	600
tgagagotg	gagtggtoc	ctocg	cc	tggtggg	gacotgaca	660
ccctctg	gaacagg	tgtaggat	tttccatg	cccttggt	tcctc	720
gagagttc	cccatgtg	tgctctct	cagccaggt	tactctctg	ctgttccoc	780
taacccatc	ccctctc	tgtaggtg	agtcocaggt	gagctocag	gtgctocot	840
ctctoc	ggaggg	ccagacag	cagtgcc	tgctgctc	cccttggt	900
ctgcagga	agctcc	tgtaggt	ctggccag	ccctccca	ccgtccctt	960
toctggag	tattagtc	gagttgtc	ctgagtgcc	ATTGCGTGG	CAGGCAGAT	1020
CAGGAGGAA	GTGCTGATT	ACTGAGCGT	TCTTCTCAC	CTGCTTGGG	CGAGTGCA	1080
CAGCTGTGC	GCTGCTGAG	CCGCGCGCG	TGCGCCCTC	CTGCTTGGT	TGCCCTGCC	1140
TACAGAGABA	TGCTGTCC	TGGtagtc	ccgaccca	tgaggtcc	agctccotgt	1200
tagttttga	ggagggag	gottttga	tgctccctc	tggtgtg	aaagtagt	1260
ctctctg	ctgocctg	ccgtttc	gtccctatg	actccocct	ccagaggt	1320
gtgagccoc	ccctocot	ccgtccotc	tgccocctc	taacattt	ccctgaca	1380
agtgtctc	tgctctcc	atgcatct	tactccag	ctctggctc	ctgcttctg	1440
ctctctga	ggaggtgc	ccctggtag	ctccacac	ctccacata	gaagtcag	1500
gocac	agagocotc	ccctccag	ccatctctc	ccctccoc	ccatccot	1560
ttgtccot	ctctctgt	tocttccot	ccctccoc	ctgctccot	ccctccot	1620
gtcctgtg	agctctct	ctgacccag	tgctgtta	gatgtgtg	atccgtgt	1680
gaacagac	gaatgtct	ctgctctc	gagcttcc	ctccaggtg	aggtccag	1740
ccacacat	acccacata	atggtctc	tgagattc	cagagatt	ccagacaa	1800
tagacagct	tgctgtg	taggtctc	ccctgtgt	ccagcactg	tgagaggtg	1860
agctgagag	atggtgtg	ccagaggt	tgagccag	ctgacata	tagtgagcc	1920
ctgtctctc	acacacac	aaatagct	ggtgtgtg	cacac	ctgtctcc	1980
ctatggag	gataaggtg	gaggtgtg	tgaggtgtg	aggtccag	tgagtcag	2040
gtgtgtg	ccctgac	ccaggtgtg	ccaggtg	agctgtgt	ccacacac	2100
acacacac	gaatgac	cagctctc	tgctgag	tgaggtgtg	tgaggtgtg	2160

[Drawing 25]



[Drawing 26]



[Drawing 27]

ttttttttttt gttttttttt tttttttttt aattttttttt gttttttttt	60
ttttttttttt tttttttttt aattttttttt tttttttttt gttttttttt	120
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	180
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	240
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	300
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	360
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	420
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	480
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	540
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	600
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	660
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	720
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	780
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	840
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	900
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	960
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1020
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1080
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1140
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1200
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1260
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1320
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1380
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1440
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1500
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1560
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1620
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1680
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1740
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1800
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1860
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1920
ttttttttttt tttttttttt tttttttttt gttttttttt gttttttttt	1980

[Drawing 28]

ttatggag gtaaggtg gagggttt tgggttgg aggttaagt tgggttgg	2040
gaggtttg ttatgtat ttatgttgg gtttgggt aggtttgt ttatggag	2100
aaaaaaag gaaatgat tgggttat ttttggag ttttgggt ttttgggt	2160
atttttgt ggggttat ggggtttt ttgggggt ttttttgg gtttgggt	2220
gggtggag ggggttgt ttttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt	2280
gtggggag ttttgggt aggttttt ttgggggt ttttgggt gtttgggt	2340
ttgttgtg aggttttt ttgggggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt	2400
aggttgtg ttgggttt aggttttt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	2460
ttttttgg gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2520
ttttttgg gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2580
ttttttgg gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2640
gatttttt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2700
ttttttgg gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2760
aggttgtg atttttgt ttgggtgt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	2820
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	2880
gggttgtg aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	2940
gggttgtg aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3000
aggttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3060
gaaatgat gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3120
ttgttgtt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3180
ggttgttt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3240
atttttgt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3300
gggttgtt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3360
ttttttgg gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3420
gggttgtt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3480
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3540
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3600
tttttgtt aggttgtt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3660
gatttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3720
tttttgtt gtttgggt gtttgggt ttttgggt gtttgggt gtttgggt	3780
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3840
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3900
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	3960

[Drawing 29]

ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4020
gatttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4080
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4140
aggttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4200
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4260
gggttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4320
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4380
aggttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4440
gatttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4500
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4560
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4620
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4680
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4740
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4800
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4860
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4920
ttgttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	4980
aggttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5040
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5100
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5160
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5220
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5280
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5340
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5400
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5460
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5520
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5580
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5640
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5700
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5760
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5820
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5880
gttttgtt ttgttgtt aggttgtt gtttgggt gtttgggt gtttgggt	5940

[Drawing 30]

ggttgggtt aatttgggtt ttgtgggtt aagtgtttt ttgtttta ttittoggt	6000
agttgaggtt ataggaggtt attatttgt ttgttaatt tttttgtt tttagtagg	6060
aggggtttt atttgtttg ttgggttgt ttgttttt ttatttgtg atttgttgt	6120
tttgttttt taagtgttg ggtttatgg oggttgttt ttgttgtgt taattttag	6180
ttttatata tttagttaa tagtttttg atagatata agatttttt ttgttttta	6240
aaatttttt agaatgtgt tttagtttgt atatttttt ttataaagt aatttgttt	6300
tatttatata tttttaaaa ggtatgaga gaatttgtg tttttttg ttgttttt	6360
tagttttta gtttttttt ttagggaag ttatttttt ttgttttta ttgttttt	6420
gttgttgtt ttttttgt ttgttttg oggttgttt ttgttgttt ggaatttat	6480
gttgttgt ttatttttt ttgttgttg gttttttg attatttgt tttagaata	6540
tttgttgt ttgaatttt gtttttgt tttagaga ttgttttt tttagtgtg	6600
ttgggttg gttaggttt aggtataga atttagagg atttgttg atagggtgt	6660
ttagggttt ttgttgttt ttttttgt tttagaga ttgttttt tttagtgtg	6720
agggaggtt attttttt ttgttgtg ttgttgtt ttattttt agtttttgt	6780
tttttgtg tttttttg ataggaggt ttattttt ttgttttg agtttgtg	6840
gttgttgt aggtttta agtttgtt ttgaatgg atttgttg ttgaatttt	6900
gttgttgt ttgttgtt ttgttgtt ttgaatgg atttgttg ttgaatttt	6960
tttttgtt ttgaatgt aaagtgtt ttgttgtt aggttgtg ttgaattta	7020
atttagatg gtatgtaga gttatttat tttaggtt ttgttgtt aggttgtt	7080
oggttgtt ttgttgtt atttgttg tttaggtt tttaggtt tttaggtt	7140
gttgttgt tttaggtt aggttgtt tttaggtt tttaggtt tttaggtt	7200
tatttgtt tttaggtt aggttgtt tttaggtt tttaggtt tttaggtt	7260
gttgttgt ttgttgtt gtttgttt tttaggtt tttaggtt tttaggtt	7320
atttgttg ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7380
aggttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7440
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7500
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7560
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7620
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7680
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7740
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7800
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7860
ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt	7920

[Drawing 31]

7980
8040
8100
8160
8220
8280
8340
8400
8460
8520
8580
8640
8700
8760
8820
8880
8940
9000
9060
9120
9180
9240
9300
9360
9420
9480
9540
9600
9660
9720
9780
9840
9900

[Drawing 32]

9960
10020
10080
10140
10200
10260
10320
10380
10440
10500
10560
10620
10680
10740
10800
10860
10920
10980
11040
11100
11160
11220
11280
11340
11400
11460
11520
11580
11640
11700
11760
11820
11880

[Drawing 33]

atcgtttttg	tttttagtgt	ttttttttat	tttatagggt	tttatttttt	agtttagagg	11940
aggtattttt	ttttattttt	tttatagttt	tttttttttt	tttaaaaggt	ttttattttt	12000
tttagaagtg	ttttttttta	tttagtagta	aggttttttt	tgtttttttt	ttttttttga	12060
atttttttat	ttttttttta	tatagtattt	ttttattttt	tgtttttatg	ttttttttga	12120
gtttttttat	tttttagatt	agattgtatt	atttatagtt	aaattttttt	tttttagatt	12180
tgattttttt	ggtttatttt	gatttttttt	tttttttttt	ggtttttttt	tttttgattt	12240
AGTGAAGTA	TTTGTAAAG	ACGGGATAG	AATATTTCG	GATTGGAAT	TATTAATGTT	12300
AATTATAITA	AGtttagtag	tgtaggttgg	gtggaggagg	aggttggatt	ttgggaattt	12360
tttgttttgt	agaggttttt	taggattttg	gatagtattg	taaaagttaa	gtttgttttt	12420
tgtagtggtg	aggggttagt	tggttttagg	tttttttttt	gtttaagagtt	ttattgtttt	12480
gggttagttt	tttttaagtt	tggttttaga	ATTAGTGTG	AGGTTTGTAT	GAAGAAGTTA	12540
AGATTATAT	GATTAGTATG	GATTGTTTGG	AGGTTACGGT	TAAATGATTT	TGTAAGATGG	12600
GGTGTAGAGA	GAATAGTCTG	GTATTGTTTA	TGATTATTGG	AGAGGTGGAG	AAAGGTGGGG	12660
taggggtttt	tttttttttt	gtattgtttt	ttgttttttt	gttatgttta	taaaagttaa	12720
ggtagtttag	attttaggtg	agaaagaggt	tttagttttg	agagtttagt	tttgttttgg	12780
aaatttaggg	ttagtgttaa	agtttgattt	ataataagtg	atttttttag	ttttttatgt	12840
gttttttggt	tttttttgat	tttttagatt	gttttttagt	tggttttttt	tttttttttt	12900
ttgttttttt	tttttttttt	tagggttttt	ttgttttttt	tttttttttt	attttttttg	12960
agtttttttt	ttattttttg	ggtttttttt	ataatgtatt	tttttgtttg	ttattgttaatt	13020
gatttttttt	gtttataaaa	ttgggttttt	tttttttttt	ttttagattt	tttttttttt	13080
tttttggttt	tttttggtta	aagtttgatt	ttaaagtttt	gttttttaag	tttttggttt	13140
tttttttagt	tttttttagt	tttttgaagt	tttatagttt	tttagttttt	tagttttttt	13200
aggttttttg	tttttttttg	ttaaagtttt	tttttttttt	gaaatgtatt	tttttttttt	13260
ttatttttgt	ttgttagtgt	ttgttttttg	aagtttagtt	cgaaaggttg	ttttttttgt	13320
gaatttaggt	ttgttttttt	tttagatttt	gagggagagtt	taagtttttt	tttgttaggt	13380
tttttagagc	ttgttttttt	tttgtatttt	gtttttttga	tttttttagg	gttttagagtt	13440
ataagtttag	ttttttttgt	gttttttagg	tttgttagtt	ttgttatagtt	aaaggtattt	13500
gttttttttg	gttaagtttt	tttaattgata	aaagagttta	ttgttttagt	gttttttagt	13560
gttttttttt	tttttttttt	ttgaattgata	aaaggtattt	aggttttttt	tttttttttt	13620
agtttttttg	tttttttttt	aaattgtttg	gttaagttta	ggttttttag	ataatagatt	13680
tttttttttt	tttttttttt	ttgttttttt	ttgttttttt	tttttttttt	tttttttttt	13740
atagAATAAA	TAGGTTTATT	ATTGTTTCSA	GCTGGGTATG	TATGCTGTTT	ATGGGTTTTT	13800
TTTTGTGATT	TGGCGAGGGG	AGTATGATAT	AATCGAATAT	AAATTTTGTA	TTTTATAGBT	13860

[Drawing 34]

TTTTGGTG GATAATGta gtagtttta cgttttggtt tatttoggga gtttttttt 13920
 ggttttggtt tttttttg togttagga tgmgtggt gngtgtto gngngngg 13980
 gsgtattga tttttggt togttagga GAGATTGAT TCGGAGATT TGTATTATT 14040
 AGTATTGAG TTGTTGAT TATGAGGTT TTAGTGATT TCGGAGGTT TTAGTATT 14100
 TGGATTAGAT TAATTAGCG TAGGAAAGTT TGTTTACGT AGGTTTATT ATGTTGATT 14160
 GTAGtgagg atgtatctt tctgttagt agttaggtt gngngtana tattgttaag 14220
 tgttttagt ttttttagt atataaag ttgtttgta tattgagt ttgtttta 14280
 ttttgggtt tttttggt tttttggt tttagaatt tggtagato gtgttgga 14340
 ttgttttt ttgttttt ttgttgga tttttttt aggttttt tgggtgtat 14400
 tatttgttt attttgtta atataaggg aggtttgg gttttgtt ttgtttagt 14460
 ttagttagt taggttagg togttaggt attttgtta gttttgtt togtttgtt 14520
 cgtttttt cgggtttta tttgttgt tttttttt aggttttt atgttgtat 14580
 tttttttt tttttttt ttttttgg tagtgttag gttttgtt tttttgtt 14640
 tttttttt tttttttt ttgttagt gttttttt gttttttt gttttttt 14700
 gttttttt tttttttt gttttttt attttttt tttttttt cgtttttt 14760
 tttttttt attttttt aggttttt gttttttt taggtttt taggtttt 14820
 atgttgtt ttgttgtt gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 14880
 ttttgttt ttgttgtt gtttgttt attttttt attttttt ttgttgtt 14940
 ttttgttt attttttt ttgttgtt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt 15000
 gtttgttt ttgttgtt tttttttt tttttttt ttgttgtt gtttgttt 15060
 ttgttgtt atgttgtt ttttgttt ttttgttt gtttgttt attttgtt 15120
 ttgttgtt gtttgttt ttttgttt ttttgttt ttgttgtt ttgttgtt 15180
 ttgttgtt ttgttgtt gtttgttt gtttgttt ttgttgtt gtttgttt 15240
 ttttgttt ttttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15300
 gtttgttt ttgttgtt ttttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt 15360
 aggttgtt gtttgttt ttttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15420
 ttgttgtt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15480
 ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15540
 ttttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15600
 gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15660
 gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15720
 ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15780
 aggttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15840

[Drawing 35]

ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15900
 ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 15960
 tttttttt cgttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16020
 CGTATCGGT CGTATGGA TATTATTGT TATGATATG TTTATGAGA ATATTTTAT 16080
 TAAGGtgag atgtatttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 16140
 ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16200
 TTAGAAGATT ATTTAGATG TCGGAGGTA CGGTTGAGT ATGTTGAGA CCGAGGAGTA 16260
 GTATAAGTT ATTTAGGTA TATGTTTA GTTTATGAA ATTTAAGA AGAGTTGGA 16320
 GGTTTGTAG gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 16380
 gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 16440
 AAGGTTAGG AGTGGAGTA CGGAGTATT ATTTATTTT TATTATGAA GAATGTTAT 16500
 GTTAAGGTT TTGTTATTC GTTAAGta gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt 16560
 ttttgttt ttgttgtt gtttgttt ttttgttt gtttgttt gtttgttt 16620
 gtttgttt ttgttgtt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16680
 gtttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16740
 ttttgttt ttgttgtt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16800
 gtttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16860
 atgttgtt atgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 16920
 TTTGTATT AAGATAGA GGGAGGAGA AGTGAAGA TAGCGTTAG TAGATAAGA 16980
 GAAGAGTAG GGTTTTTTA AGAGGAGTG AGCGGTGTT TTTTAGGTT GTTATGtat 17040
 gtttgttt ttgttgtt ttttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17100
 ttgttgtt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17160
 gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17220
 AGTTTGAAT TTGTGAGT ATTTGCGAT GATAGATT ATATTTGAA TTTAGGAGT 17280
 TTTATTTT TTGTATTA ATGTTGTA TTTTATTAT TTTTATTGA TTTGTATAT 17340
 AGTTTAGTA GTTTTAGGT AGGTTAAT TTTTATTT TGTAAATA GTTTTGGAT 17400
 TATTgtgt cgttgttt ttttgttt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 17460
 ttgttgtt atgttgtt ttgttgtt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 17520
 aggttgtt gtttgttt ttgttgtt gtttgttt gtttgttt gtttgttt 17580
 ttgttgtt ttttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17640
 gtttgttt gtttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17700
 atgttgtt ttgttgtt gtttgttt gtttgttt gtttgttt ttgttgtt 17760
 gtttgttt gtttgttt gtttgttt ttgttgtt ttgttgtt ttgttgtt 17820

[Drawing 36]

atggaatg	gaggtaga	ttgaattt	ggtgttga	ttttaggt	tatatttt	17880
atttgaat	tgatgttg	gttatttt	gaggggtt	gattatatt	ttttaggt	17940
gagtttga	tttgaatt	gaggaatg	tgatgttg	gaggtatg	ttttaggt	18000
ttggttgg	tttttttg	gggaatag	gatagttt	tttagatt	gggtatgt	18060
tagttttt	tttttttg	gtgtgttg	ttttattt	ttttagga	gtttaggg	18120
ttggttgg	tgaggtgt	ttgttttt	gttttttt	tttttttt	ttttaggt	18180
gggttttt	tttttttg	atattgtg	ttttaggg	tgaggtgt	gggtattt	18240
ttttagga	ttttaggt	tttttttg	gaggttga	tgataggt	ttttaggt	18300
gaggttgg	gtgtattt	tttagatt	tttaggtt	ttttaggt	ataggttt	18360
atgttttt	ggtttttg	attttagg	gtttaggg	gaga		18404

[Drawing 37]

ttttttgt	tagttttt	ggtttaga	ggtggggg	tttgaatg	tttgaagt	60
gggttttg	tgaggttg	ttgaatg	tgaggttg	ttttaggt	tgaggttg	120
gtgttttg	tttttttg	ggtgtgtt	ggtgtgtt	ttttaggt	ttttaggt	180
tttttttt	ggttttg	tttttttt	gaggttga	ttttaggt	ggttttg	240
gaggttga	ggttttga	tgaggttt	ttttaggt	ttttaggt	ggttttg	300
tgaggtga	ggttttg	ggttttg	gaggttga	ttttaggt	ggttttg	360
ttttaggt	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	420
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	480
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	540
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	600
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	660
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	720
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	780
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	840
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	900
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	960
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1020
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1080
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1140
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1200
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1260
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1320
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1380
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1440
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1500
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1560
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1620
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1680
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1740
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1800
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1860
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1920
gtgttttg	gtgttttg	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	ttttaggt	1980

[Drawing 38]

aggentagtg ggaagtggt ggttttagtg aggttagtg gtatttatt tgtattgtg 2040
 ttttttttt ttttaggtt tgttttgao gtatTTGTAG GATTTTAT 2100
 TGTTTTATY GAATTGCGC ATGTTTACGT AGATGAATTT GTATTGCGT TTGTTTGT 2160
 TTATGTCGA GGTTCGCGT CBTATTAITT GATGCTTTT TTGATGTTA ATGTTATAGT 2220
 TTAGGTTtg gtagggata gtaaatitt aggttaggt atagggagt atogggagt 2280
 tgtttattt ttatttttao atttttaggt gtttttatT TTGTTGAG ATGTTTTT 2340
 TGATATATG CAGATAATG ATGTTTGTG TCGCTGCAI GTGCGGttg ggaagagag 2400
 gggatgtat tagagttag ttaagtttt ttggggagz ggaatatta ggtttagtt 2460
 ttggtttg gtatttagg agtagttga gtttttagt atagggagz atgtgttag 2520
 ggtttaggg taggttagg tggagtttg ttttagttg tatgtatag tttatttag 2580
 ggttttagg tgttaggtt ggttttagg tttttattt ttttttttt tttatttto 2640
 ggttaggtt tttatttta gtaggtggt gttttattt oggaagatt ggaatttta 2700
 aatttttta ttttttga ggttttagg tattttagt tttttogtt ttttttaga 2760
 ggaatttag aggtttttt agtaggttt tattttttt ttttttana ttttaggtt 2820
 ggaagagga tagtttttag atagtaggt ggaaggtat aggttagga gatttaggg 2880
 agtagtagg taggaagtt ttttttttt ttagttttg gtaatagat tttagggag 2940
 ttttaggtt atttttagt gatttagta agtaggtt ttatgtagz ttttttagt 3000
 ttatattag atgttagaa ataattttt atatttttt ttttttagz acatttaatt 3060
 aaggttagg aggttttta gtaggttg atgttagt taggaagga gtaggaagz 3120
 agtttaggg gtaggttg ttttttagg agtaggtt aggttaggt tttagtag 3180
 tttagggg atatttttag attagtagz tttttttt tttagtagz atagttagt 3240
 ggaagagga aggaagtag aggttaggt aggttaggg tttagtagz gtaggaag 3300
 ggttaggg aggttaggt ttttttttt tattttttt tttagtagz tttagtag 3360
 agtagtagz tttagtttt gtaggttag ggaatttag tttagtagz aggttttt 3420
 tttagttta aggtatttt ggtttttga ttttttagz ggaaggtt aggttagga 3480
 aggttagga atgttttta gatttagz tttagtagz ggaaggtt gtttttag 3540
 ttttttttt attaggtta gtttagtta gtaggttt tttagtagz ttgttttt 3600
 tttaggtt ttattttgt attttagg aggttttt tttagtagz tttagtag 3660
 tagtaggg aggttaggt aggttagga aggttaggt tttagtagz tttagtag 3720
 gtttaggt aggttaggt tttagtagz aggttaggt tttagtagz tttagtag 3780
 aggttaggt tttagtagz aggttaggt aggttaggt tttagtagz tttagtag 3840
 tttagtagz aggttaggt aggttaggt tttagtagz aggttaggt tttagtag 3900
 gtttaggt aggttaggt aggttaggt tttagtagz aggttaggt tttagtag 3960

[Drawing 39]

agtttaggt ttttttttt tttaggttg gtttaggga gtttaggtt taggaagz 4020
 tttaggga gttatttta gtttagggt tttaggttg tttaggttg tttaggttg 4080
 tttaggttt tttaggttg aggttaggt ggaaggttg ggaaggttg ggaaggttt 4140
 aggttaggt tttaggttg gtttaggtt tttaggttg tttaggttg tttaggttg 4200
 tttaggttg tttaggttg tttaggttg tttaggttg tttaggttg tttaggttg 4260
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4320
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4380
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4440
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4500
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4560
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4620
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4680
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4740
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4800
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4860
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4920
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 4980
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5040
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5100
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5160
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5220
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5280
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5340
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5400
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5460
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5520
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5580
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5640
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5700
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5760
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5820
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5880
 TTGTGCTA GTATGATTT TTGTGCTG GTATGATTT TTGTGCTA GTATGATTT 5940

[Drawing 40]

tggtttagta	tggttttga	attattgta	tttttttta	tgtaagagt	tggtttcgt	6000
tttttttagt	tggttttga	tttaggttt	tttttttga	tggtttatt	tttaggttta	6060
gttttttttt	tttaggtgt	ttattgttg	ctTTTGATGT	AGTTGGTATT	GATGTAGTGA	6120
GAATGAGGGA	TGTTATTGTT	TGTTTTTGT	AGGATTATTG	GATTGTGATT	AATTgagagt	6180
agagagagag	agagagagat	ggtttgagt	agtagaggt	ttatttatatt	tggtttagat	6240
tttttttagt	ttattggtta	ttttgtttt	agaggttatg	aggtttgagg	aggtttgtg	6300
gtattagggg	tggttttga	ttttgttga	aggtttgag	aggttttaa	aggttttga	6360
agtaggggt	attttgttg	ttgtttgta	aggtttttt	ttgtttgag	tagaggttt	6420
ttgtttgag	aggtttttt	gtgtttggt	tggtttggt	gtttttttt	gtgtttgag	6480
tggttttg	tggtttgag	aggtttggt	aggtttgag	gtttttttt	gtgtttgag	6540
gtgttttg	gttttttga	GAAGAAATTT	TTTGTAGCG	TTTTTTTGT	TTTTTTTGT	6600
TGTTTGT	TTTGTAGCG	GTGTAAATTT	TTTAAATTT	TGTTTGT	AATTTGT	6660
tggttttg	aggtttgta	ttgttttta	aggtttgta	ttgtttgag	aggtttgag	6720
aggtttgta	aggtttgag	tggtttgag	aggtttgag	ttgtttgag	gtttttgta	6780
gtgtttgta	ttgtttgag	ttgtttgag	tggttttta	ttgtttgag	TAAATTTT	6840
TTAGAAAGTA	TTTTTGT	TATTTGTGA	TTTTTGT	TTTGTAGT	TAAATTTG	6900
TTTTTGT	TTTGTAGT	TATTTGT	GTATAGTAC	GTGTGAGT	aggtttgag	6960
aggtttgag	aggtttgag	ttgtttgag	ttgtttgag	aggtttgag	aggtttgag	7020
aggtttgag	aggtttgag	ttgtttgag	GTATAGTGA	TAAAGGCTT	TGAGGTTTT	7080
TTAATTTG	TTTTTTGA	ATTTTTAT	AGTTGTGA	GTGTGTGA	GTTTTTAA	7140
TTTTTTAT	TGTAGCTTT	ATTTGAGG	aggtttgag	aggtttgag	aggtttgag	7200
gtttttttt	tggtttttt	aggtttgag	ttgtttgag	gtgtttttt	ttgtttttt	7260
atattgtgt	ttgtttgag	aggtttgag	gtgtttttt	gtgtttttt	gtgtttttt	7320
TGTATATGA	TTTTGATG	GTGATTTT	AGCGGAGT	TTGGTTAGT	TTTTGTTG	7380
TTATTAGTA	TAGAAATAG	GAAGTTTTA	GTGTGTTGA	GTTTTTTAC	TATAGAAAC	7440
GTTTAGGTT	GTTTTTGAT	TTGTAGTAT	GTTTTTGTT	GTGTGTTGA	TATGTGTTA	7500
TGTATTAT	tggtttgag	aggtttgag	aggtttgag	ttgtttgag	aggtttgag	7560
ttgtttgag	atattttg	aggtttgag	aggtttgag	atattttg	ttgtttgag	7620
tggtttgag	gtttttgag	ttatttttt	atattttg	ttatttttt	ttgtttgag	7680
tggtttgag	atatttttt	ttatttttt	aggtttgag	aggtttgag	atatttttt	7740
gtttttgag	ttttttgag	ttttttgag	gtttttgag	gtttttgag	ttttttgag	7800
gtttttgag	gtttttgag	ttttttgag	ttttttgag	ttttttgag	gtttttgag	7860
ttttttgag	ttttttgag	ttttttgag	aggtttttt	ttttttgag	aggtttttt	7920

[Drawing 41]

gtaatttta aatatattg aggaagagz ttaagatga attttogta agatagat 7980
 tttgttttag tagagattag agttaagagz aatagtagat agagttata ttatagagag 8040
 tagtggagga tgaattata gatttaagt atagagagz agatagat gattttogtt 8100
 aggaagagz aggaatata tttattgagz aatagtagat atagagat tttgtttg 8160
 tttgtttg tttattgagz agatattagz atttaagagz atttaagagz 8220
 tagaagtagz aatattgatt tttttogagz gttatttttt tttttagagz aatattgagz 8280
 tttttatagz tttttattta tagaattta agtattgagz aatattatagz attttttg 8340
 aggaagagz aggaattgagz gttttgagz tttttatttt tagaagagz aggaagagz 8400
 gtaatttttt tttttattgagz gttttgagz aggaagagz gttttatttt tttttatttt 8460
 tttttatttt gttttattgagz gttttatttt tagaatttttt tttttatttt 8520
 aggttttttt agttttattg tttttattgagz gttttatttt tagaatttttt aggaagagz 8580
 aggttttttt tttttatttt tagaatttttt aggttttttt gttttatttt gttttatttt 8640
 aggaagagz gttttattgagz aggtttattg tttttatttt tagaagagz aggtttattg 8700
 tagaatttttt gttttattgagz aatattgagz aatatttttt tttttatttt tttttatttt 8760
 aggtttatttt gttttatttt aatatttttt tttttatttt tttttatttt tttttatttt 8820
 tttttatttt agttttattg tttttatttt tttttatttt tttttatttt tttttatttt 8880
 attttatttt agttttattg tttttatttt tttttatttt tttttatttt tttttatttt 8940
 taggttttttt taggttttttt tttttatttt aggtttattg aggaagagz aggtttattg 9000
 aggtttattg aggtttattg tttttatttt tttttatttt aggtttattg aggaagagz 9060
 taggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggaagagz gttttattg 9120
 aggtttattg aggaagagz gttttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9180
 aggtttattg aggtttattg gttttattg aatatttttt aggtttattg aggtttattg 9240
 tttttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg tttttatttt aggtttattg 9300
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9360
 tttttatttt aggtttattg tttttatttt aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9420
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9480
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9540
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9600
 tttttatttt aggtttattg tttttatttt tttttatttt tttttatttt tttttatttt 9660
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9720
 tttttatttt aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9780
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9840
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 9900

[Drawing 42]

aggtttattg tttttatttt tttttatttt aggtttattg aggtttattg tttttatttt 9960
 aggtttattg tttttatttt aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10020
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10080
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10140
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10200
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10260
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10320
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10380
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10440
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10500
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10560
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10620
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10680
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10740
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10800
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10860
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10920
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 10980
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11040
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11100
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11160
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11220
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11280
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11340
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11400
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11460
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11520
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11580
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11640
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11700
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11760
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11820
 aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg aggtttattg 11880

[Drawing 43]

tgattttaga gtttttaaat attaaggtat atgatttgt ttatttgaat ttttaaatat	11940
aatatttaat atgtttaaat taanaogaga aaagttagtt taataggaga tatataagan	12000
atatatatgt gttgttttt ttaggagaga aaattgagt ttggagagt aggttazgz	12060
gagatatttg gttttttata tattttttg aatgttatat gattgatatg tattattttt	12120
ataaatata atagttaat tggaaataat ttttggaaa ttttaggt ataggagaz	12180
tttttggtt ttatttgat gttgttgtt taagtgtga taanaogaga ttgttogg	12240
ogtaggttt taogttgta atttagtat ttggaggt taagttggo ggttaogag	12300
gttagaggt ogagatttt ttgttaata tggtaaat tttttttat taanaata	12360
aaaaattag ttggtatga tggtaggtt ttgtaattt agttattgg gaggttgag	12420
taggagatt attgaattt aggaagtga gttttagag agttaagtt atattattgt	12480
atttagttt gtttaatat taagatttta ttttaaaaa aaaaaaaaa taagttagg	12540
ttgttgttt aaatttatg aaatttatgt atgttttgt ttggtaaaa gaagaaag	12600
ttttaagtt aaatagttt attttttat gtttaattt ttattttt tagaaattt	12660
aaatttaatt gtttttttt aaaaaaggtt tttttttt tttttttt ttttgttt	12720
atttgtttt gtttttttt ttttttgtt gttttggga atttgtttg taagttaatt	12780
gtatggtta gttttgata ttttttgtt ttggtatta ttttagatt tggaaatto	12840
gaggaattt taogtttao gtttaaggtt aggaagtga tatgaaggt ttgtttgac	12900
gaggaattt ogttgggtt ttogtttatt tggaggttt tagagtttag ttogatttt	12960
ggtattggt aggttttaa taataagtt ogttagtta ttgtttata ttgtttata	13020
agtatgttt ttgttttta tatatatgt ttgtttga taagttagta aggtttata	13080
tatatgata gtatatatat tttattattt atgtttatt atatatatat ttgtttggt	13140
gtatatttt agtatgga taataattt atatatag agtttttag ttattgtta	13200
gtattaaag ttattgtat ttgttttta agtattttt tttaggttt aaatttttt	13260
agttggag agttatttg gtatttaga gaatttaatt aggtatttt ttgtttta	13320
tggagaggt aggaatttt ttgaaggtt taagttaag agtatgaatt taatanaag	13380
gtatgtttt ttatttttt ttgtaggaa ataaaaatt attttttta ttgtttat	13440
gtatgggt tttagattt ttttatatat agattttat ttaggttta gatattttg	13500
tgattagga attattttt ttatttttt atggaggaa ataaogtag ggaatttaag	13560
aatataga gtaattgtt gttatttag aaaaaaaat tttttttt gaattagaa	13620
gataaagta gatttaagg ttaggogtag ttgttaagt ttgtaattt agtttttgt	13680
gaggttgg ttgttattt atttatatt aagtttga gtatttag aaatttag	13740
aaatttgtt ttttaaaa atataaatt tagttagta ttgtatata ttttgtat	13800
tttgtatt ttgaattt agatggag atatttga ttgaggtg taagattat	13860

[Drawing 44]

agttagttat ggttggtta tigtatctg gtttagtga tagatgaga ttttggtta 13920
 aaaaataaaa atatagttg ggttagtga tttatattgt aatttagta ttttgagg 13980
 tagatgagg aggtatttt ggttagga gtttagatt agttggtaa tatagtgaa 14040
 ttttattttt attagttgt aatttagtt ttttagagg tggatgtgt agttagtga 14100
 gattatgta tttatttta gtttagtga tagatgaa ttttggtta aaaaaaaa 14160
 aattaaaat tatatagtt aggtattgt gtagatag agtaggta gtttagagg 14220
 gtaataagg taataaatt ttagaagg ttttagatt ttttagtt tagaatttt 14280
 gtttagtaa ttagttatt aatttttt aatttaggt gtagaagt gtagaagt 14340
 aggttttag ttttagttt ttttatata ttttatatt ttttaggta aatttatata 14400
 gtaggtgta ttttatatt ttttagaata gtagaagg ttttagatt ttagaatt 14460
 gtttaggtt atagttatt tagtagagg gtagaagg taoggtgtt agtagtga 14520
 gtttaggtt tttttttt aatttatat ttagtaggt agtagtga gtagaagg 14580
 tggatgtgt tatagttat gtagaagg gtagaagg gttttttt aggttagta 14640
 tggatgga taagaggtt gtagatag agtttatgt agtaggtt agtaggtt 14700
 agtttatgt gtagagta agttgttt aggttagg atttgtgt aggttatgt 14760
 ttaggttag gtagaatt taaggtga atttgtta gtagaatt gtttaggta 14820
 ttttagga aattattt aggttagt aggttaga agtttagt gtagaatt 14880
 aggttagt tagatgta aggttagt ttagtagg gtagatga gtagaagg 14940
 taagattag taggttag gattttta tttataatt agtttagt ttagtagg 15000
 gtttatatt tttttttt tttttttt ttttaggt aggttttt tagttatt 15060
 taggttag gtagaggt taatttag ttttatatt ttttaggt ttttaggt 15120
 taattttt gtttaggt ttttaggt ttttaggt aggttatgt tataggtta 15180
 gtttatatt tttttgtt ttttaggt gtagaatt tatatgtt gtaggttag 15240
 ttttaggt ttttaggt gatttatgt ttttaggt ttaggtgt aggttatgt 15300
 gtttaggt tataggt taggtgtt tttttttt ttttttag taggtgtt 15360
 tttttttt tttttttt tttttttt attaggtt tttttttt tttttttt 15420
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 15480
 tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt tttttttt 15540
 tttttttt atagattt gtttatatt ttttaggt gtaggtgt aatttatgt 15600
 tataggt gtagattt ttttaggt gtagattt gtttaggt ttttaggt 15660
 tagatgta gtagattt attatatta gtttatatt agtagaata tagtaggt 15720
 tagtagga gtagattt ttttatgt ttttaggt gtttaggt ttttaggt 15780
 aggtattt ttttaggt ttttatatt ttttaggt attatatt taggtatta 15840

[Drawing 45]

tattaggt tttttttt tagatgga gttttttt gtttaggt ttttaggt 15900
 attttaggt ttagaatt tttttttt gttttttt agtttagga ttagaatt 15960
 agtttatgt attttaggt gttttttt ttttatatt agtttatgt ttttatatt 16020
 ttttaggt ttttaggt ttttatatt ttttaggt aggttatgt gttttttt 16080
 ttttaggt ttttaggt ttttaggt attttttt ttttaggt attttaggt 16140
 ttttaggt aggttatgt gtttaggt tttttttt attttaggt ttttaggt 16200
 gtttatatt aggttatgt ttttaggt ttttaggt taatttat ttttatatt 16260
 gtttatatt aggttatgt gtttaggt tttttttt tttttttt ttttaggt 16320
 gtttatatt gtttaggt ttttaggt gtttatatt tataggtgt ttttaggt 16380
 attttaggt ttttaggt ttttatatt ttttaggt attttaggt ttttaggt 16440
 ttttatatt ttttaggt attttatatt ttttaggt attttaggt ttttaggt 16500
 ttttaggt ttttatatt ttttaggt taattttt gtttaggt ttttaggt 16560
 ttttaggt gtttaggt attttatgt gtttaggt ttttatatt gtttaggt 16620
 ttttaggt gtttaggt taatttat gtttaggt ttttaggt attttatgt 16680
 gtttaggt ttttaggt gtttaggt ttttaggt gtttaggt gtttaggt 16740
 ttttatatt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 16800
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 16860
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 16920
 ttttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 16980
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17040
 ttttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17100
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17160
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17220
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17280
 GGGGAGGGT GGTAGGGG GGGGTGAT TAGGGGATA GTGGTTAA 17340
 TTAGGTAGG AAGATGTT TAGTAATTG TTATTTTTT TTGATTTTG TTGTTAGGT 17400
 TATATatt gtaggata attttaggt attttaggt aggttaggt taggttaggt 17460
 gtttaggt gtaggata attttaggt attttaggt attttaggt gtaggata 17520
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17580
 ttttaggt gtttaggt gtaggata gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17640
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17700
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17760
 gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt gtttaggt 17820

[Drawing 46]

```

ggggggggt tttagttag gttaggttt gggtaggt taggttagt taggttata 17880
gggggggtt gtttagggg atgggtttg gagggttag gggattagg gaggagaga 17940
tggggttgt taggttagt agagattgat atttaggta agttatagg gtatttatta 18000
ttgtttgaa tattaaggtt ttttttttt ttttagttag ataggggagg gttattttt 18060
aggagggagt taagttagt tttagtagt gtttagggg tggtaggtt atgggggta 18120
gagtagagt ttttagttg tttagtagt tggtaggtt aggtttttg gtttagtag 18180
atttagtaa gaggtaggt tttagtagt tttagtagt aggttagggt ttatttttt 18240
tttagaggt taggttagt aggttaggt gaggtaggt taggttagt atgatttgt 18300
tttttaggt tttagtagt gtttagtaa taggttagt gtttaggtt gtttaggtg 18360
gttagtagt tagatttgg ttttaggtg gtttaggtg atg 18404

```

[Drawing 47]

(a)

Wild type DNA

```

5'-AGTCGCGATGCCAGCTCGCTCG-3' sense strand
3'-TCGAGCGCTACGGTCGAGCGAGC-5' antisense strand

```

(b)

Blauflit

```

5'-AGTCGCGATGTTAGTTGTTTCG-3' sense strand
3'-TTGAGCGCTATGGTTGAGCGAGC-5' antisense strand

```

(c)

FW primer

```

5'-AGTCGCGA
5'-AGTCGCGATGTTAGTTGTTTCG-3' sense strand
3'-TCAAGCAAGC-5' RV primer

```

(d)

FW primer

```

5'-AACTGCGA
3'-TTGAGCGCTATGGTTGAGCGAGC-5' antisense strand
3'-TTGAGCGAGC-5' RV primer

```

[Drawing 48]

(a)

REP-S1 : 5' -CAGGCCAGTGGAGTGGCAG-3'

(b)

REP-AS1 : 5' -GAGGAGGTGCAGCTAGTCTG-3'

(c)

(#7441)

CAGGCCAGTGGAGTGGCAGGCCAGAACTGGGACCACCGGGTGGTGA

REP-S1

HpaII

GGCGGCCCGCACTGGGAGCTGCATCTGAGGCTTAGTCCCTGAGCTCTCT

HpaII

GCCTGCCAGACTAGCTGCACCTCCTC (#7508)

REP-AS1

[Drawing 49]

(a)

REP-S2 : 5' -CAAAAGCACTGGCTTTGGAACC-3'

(b)

REP-AS2 : 5' -ATCGAGTGAGTCCTGCTGGAT-3'

(c)

(#6858)

CAAAAGCACTGGCTTTGGAACCGACTGTCTGGGTTTGAATCCTGGCACTG

REP-S2

Hpa II

CAGCTGACTCACTGATGGACTCAGGCAATGCCTTAAACTCCCTGAGCCTC

AGGTTCTTGTCTGTAAATGATAAAGATAGCCCTGTTTCATAGGGCTGT

GGTGAGAAACCAATCAGACAAGGCATGTGAACGCCATTATAGCACAGCG

CCCGGCATCCAGCAGGACTCACTCGAT

(#7084)

Hpa II

REP-AS2

[Drawing 50]

(a)

SHP1-PF1: 5' -TGTCTGGAGGCCACGGTCAATGA-3'

(b)

SHP1-PR1: 5' -GTTTGTATTCGGTTGTGTGTCATGCTC-3'

[Drawing 51]

(a)

SHP-LF1: 5'-GCCAGTTCATTGAAACCACT-3'

(b)

SHP-LR1: 5'-CCTTGTCTTCTCCTTGTCT-3'

[Drawing 52]

(a)

MF2: 5'-GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC-3'

(b)

MR2: 5'-TCACGCATACGAACCCAAACG-3'

(c)

(#7037)

GAACGCCATTATAGCAGCGCCCGGCATCCAGCAGGACTCACTCGAT

MF2

GACAGTTGTACCGCCATCATTGTTATTAGCGTGGGCCAGGGAGGCT

GCSTAAAAGCAGCTGGTGGAGGAGGGAGAGATGCCGTGGGACCGCTCT

GGGTTGCGATGCGTGA (#7195)

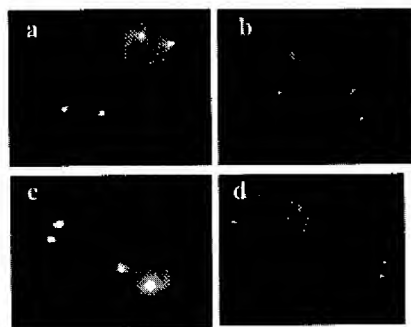
MR2

[Drawing 53]

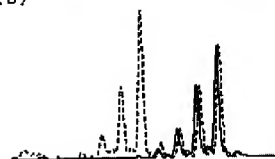
(a)

FISH analysis of ILTMot and NK-YS cells with chromosome 12 or *SHP1*-specific probes

cells	probe	positive signal No.(%)					
		0	1	2	3	4	more
ILTMot	Ch #12	1	1	97	1	0	0
	SHP1	1	2	95	1	1	0
NK-YS	Ch #12	0	0	99	1	0	0
	SHP1	1	3	91	4	1	0



(b)



Microsatellite marker	LOH
D12S356	15/19 (79 %)
D12S336	6/16 (38 %)

CORRECTION OR AMENDMENT

[Kind of official gazette]Printing of amendment by the regulation of 2 of Article 17 of Patent Law

[Section classification] The 1st classification of the part I gate

[Publication date]April 14, Heisei 17 (2005.4.14)

[Publication No.]JP,2004-128,A (P2004-128A)

[Date of Publication]January 8, Heisei 16 (2004.1.8)

[Annual volume number] Public presentation / registration gazette 2004-001

[Application number]Application for patent 2002-331107 (P2002-331107)

[The 7th edition of International Patent Classification]

C12Q 1/68

C12N 15/09

C12Q 1/02

C12Q 1/42

C12Q 1/44

G01N 27/447

G01N 33/53

G01N 33/566

[FI]

C12Q 1/68 ZNA A

C12Q 1/02

C12Q 1/42

C12Q 1/44

G01N 33/53 D

G01N 33/53 M

G01N 33/566

C12N 15/00 A

G01N 27/26 301 A

G01N 27/26 315 J

[Written amendment]

[Filing date]June 3, Heisei 16 (2004.6.3)

[Amendment 1]

[Document to be Amended]Specification

[Item(s) to be Amended]0046

[Method of Amendment]Change

[The contents of amendment]

[0046]

Therefore, in this invention, SHP1 gene expression can be judged using four-fold marker by the maximum called loss of ornamentation and mRNA of gene DNA, protein, and allele. namely,

one hematopoietic organ tumor cell called a SHP1 gene-expression fall -- since a specific phenomenon can be checked in four steps, hematopoietic organ tumor cells are detectable by very high singularity.

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-128

(P2004-128A)

(43) 公開日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/44	
C 1 2 Q 1/44	G O 1 N 33/53 D	
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 98 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-331107 (P2002-331107)	(71) 出願人	396020800
(22) 出願日	平成14年11月14日 (2002.11.14)		科学技術振興事業団
(31) 優先権主張番号	特願2002-103495 (P2002-103495)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(32) 優先日	平成14年4月5日 (2002.4.5)	(74) 代理人	100080034
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 原 謙三
		(72) 発明者	岡 剛史
			岡山県岡山市津島中1丁目4番2-304号
		(72) 発明者	大内田 守
			岡山県岡山市門田屋敷2丁目2番58-106号
		Fターム(参考)	4B024 AA11 CA01 CA12 CA20 HA09 HA12 HA20
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 造血器腫瘍細胞検出方法および造血器腫瘍細胞検出キット

(57) 【要約】

【課題】 分子生物学的知見を利用して、造血器腫瘍細胞の高感度かつ高特異的に検出する造血器腫瘍細胞検出方法および検出キットを提供する。

【解決手段】 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を定量するとともに、上記検体試料から得られる S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する。これによって、一つの遺伝情報により造血器腫瘍細胞の有無を2段階で確認するため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する S H P 1 遺伝子メチル化確認工程、

(2) 上記検体試料から得られる S H P 1 蛋白質および S H P 1 m R N A の少なくとも一方の発現量を定量する S H P 1 遺伝子産物定量工程、および、

(3) 上記検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失 (L O H) の有無を確認する S H P 1 遺伝子 L O H 確認工程、

の少なくとも何れかを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出方法。

10

【請求項 2】

上記 S H P 1 遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、

上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記 S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応法 (P C R) を実施する遺伝子増幅試行段階と、

増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれることを特徴とする請求項 1 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

20

【請求項 3】

上記プライマーが、さらに、配列番号 1 または 2 に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることを特徴とする請求項 2 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 4】

上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することを特徴とする請求項 2 または 3 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 5】

上記遺伝子切断試行段階では、制限酵素として、メチル化感受性制限酵素を用いることを特徴とする請求項 2 、 3 または 4 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

30

【請求項 6】

上記 S H P 1 遺伝子メチル化確認工程には、

上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、

重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、 S H P 1 遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれることを特徴とする請求項 1 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 7】

上記メチル化シトシン含有判定段階では、 P C R によりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかが用いられることを特徴とする請求項 6 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

40

【請求項 8】

上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることを特徴とする請求項 6 または 7 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 9】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、 S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体を用いて S H P 1 蛋白質を定量することを特徴とする請求項 1 ないし 8 の何れか 1 項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 10】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法またはウエスタンブロッティング法に

50

より S H P 1 蛋白質が定量されることを特徴とする請求項 9 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 1】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いて S H P 1 遺伝子の m R N A の発現を検出することにより、S H P 1 m R N A を定量することを特徴とする請求項 1 ないし 8 の何れか 1 項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 2】

上記 S H P 1 遺伝子産物定量工程では、ノーザンブロッティング法、逆転写 P C R 法、リアルタイム P C R 法、または R N A i n s i t u ハイブリダイゼーション法により S H P 1 遺伝子の m R N A の発現が検出されることを特徴とする請求項 1 1 に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。 10

【請求項 1 3】

異型接合性喪失の有無の確認は、上記 S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方、または、上記 S H P 遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型のような遺伝子多型を、P C R を用いたフラグメント解析により実施されることを特徴とする請求項 1 ないし 1 2 の何れか 1 項に記載の造血器腫瘍細胞検出方法。

【請求項 1 4】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

(1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、および 20

(2) シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅する P C R 用のプライマーと、上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照 D N A とのうち、少なくとも一方を含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項 1 5】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

(1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、 30

(2) 遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および

(3) 配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。

【請求項 1 6】

造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、

造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーを含むことを特徴とする造血器腫瘍細胞検出キット。 40

【請求項 1 7】

さらに、P C R 用試薬、および、制限酵素反応用試薬の少なくとも一方を含むことを特徴とする請求項 1 4、1 5 または 1 6 に記載の造血器腫瘍細胞検出キット。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

【発明の属する技術分野】

本発明は、造血器腫瘍細胞検出方法および該検出方法に好適に用いられる造血器腫瘍細胞検出キットに関するものであり、特に、例えば、悪性リンパ腫や白血病等に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子産物の発現減少あるいは消失またはこれを 50

コードする S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することによって、造血器腫瘍細胞を高感度かつ高特異的に検出できる検出方法および検出キットに関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ヒト (H o m o s a p i e n s) における悪性リンパ腫や白血病等の造血器腫瘍 (血液系の腫瘍) には、難治性で極めて予後の悪いものから比較的予後のよいものまで様々な種類が知られている。この造血器腫瘍の治療には、各種化学療法や放射線療法、あるいは免疫療法といった種々の療法がすでに実用化されているが、このような治療の結果、ほぼ腫瘍細胞が退縮したとしても、わずかに腫瘍細胞が生存していれば造血器腫瘍の再発は免れない。

10

【0003】

上記造血器腫瘍の診断は、従来では、複数の診断手法を併用することにより総合的に実施されている。具体的には、末梢血や各種生検材料を用いて、組織染色や免疫染色等による形態学的な観察や組織学的な観察が実施されたり、さらには、種々の分子生物学的解析や染色体解析等も実施されたりしている。また、上記造血器腫瘍の診断では、判定までにか

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

上記従来の各診断手法は、それ単独では造血器腫瘍細胞を高感度、高特異的、かつ迅速に検出できるものではない。それゆえ、これら従来の診断手法では、複数を併用して総合的に判断しなければ造血器腫瘍を診断することができない。

20

【0005】

つまり、従来の診断手法を使用する限り、複数の診断手法を併用しなければならないため、診断の煩雑化を招くだけでなく時間がかかり、造血器腫瘍細胞検出感度も特異性も高いことから、医師の専門的な判断が診断に大きな比重を占めることになる。そのため、従来では、造血器腫瘍の診断技術は、実質的に医療現場での利用に限られており、各々の疾患には対応できるが、集団検診による造血器腫瘍の早期発見・早期治療を目的としては利用されていない。

【0006】

造血器腫瘍細胞をより高感度かつ高特異的に実施するには、造血器腫瘍細胞に特異的であり、かつ広い範囲の造血器腫瘍に見られる感度の高いマーカーを用いることが考えられる。このようなマーカーを用いれば、造血器腫瘍の早期発見・診断を容易かつ迅速に実施することができ、医療上、悪性リンパ腫や白血病等の早期治療や再発予防に応用することが可能となるだけでなく、臨床検査産業や医薬品産業等にも利用可能な診断技術とすることができ、産業の発展に寄与することが可能となる。しかしながら、このようなマーカーは現在までのところ知られていない。

30

【0007】

本発明は上記課題に鑑みなされたものであって、その目的は、分子生物学的知見を利用して、迅速且つ簡便に造血器腫瘍細胞を高感度かつ高特異的に微量の患者検体から検出し造血器腫瘍の早期発見・診断および早期治療を容易にし、集団検診にも適用可能な造血器腫瘍細胞検出方法および検出キットを提供することにある。

40

【0008】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題に鑑み鋭意検討した結果、広い範囲の悪性の造血器腫瘍では、プロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られ、しかも悪性度の高い造血器腫瘍において、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制の傾向が強くなることを見出し、S H P 1 遺伝子産物およびこれをコードする S H P 1 遺伝子の双方をマーカーとして用いることで、造血器腫瘍細胞の高感度、高特異的、かつ短時間に検出でき、かつ産業上利用できる造血器腫瘍細胞検出技術を実現し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

50

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、上記の課題を解決するために、(1) 造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質および S H P 1 m R N A の少なくとも一方の発現量を定量する S H P 1 遺伝子産物定量工程、(2) 上記検体試料から得られる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する S H P 1 遺伝子メチル化確認工程、および(3) 上記検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失(L O H) の有無を確認する S H P 1 遺伝子 L O H 確認工程、の少なくとも一方を含むことを特徴としている。

【 0 0 1 0 】

上記 S H P 1 遺伝子産物の発現抑制は、悪性の造血器腫瘍細胞に極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。また、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制は、S H P 1 遺伝子のメチル化によるものである。さらに、DNAメチル化による S H P 1 遺伝子の転写抑制の前後には、S H P 1 遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失している。

【 0 0 1 1 】

上記方法によれば、上記知見を利用して、検体試料から得られる S H P 1 遺伝子のメチル化を確認し、造血器腫瘍細胞の存在を検出することで、悪性の造血器腫瘍細胞の存在の有無をスクリーニングし、一方検体試料中の S H P 1 遺伝子産物、具体的には S H P 1 蛋白質、または S H P 1 m R N A、あるいはその両方の発現を定量する。

【 0 0 1 2 】

すなわち、上記方法では、S H P 1 遺伝子の不活性化を、遺伝子 D N A の修飾と m R N A と蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカを用いて判定できることになる。すなわち、S H P 1 遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を 4 段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

【 0 0 1 3 】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい一例としては、上記 S H P 1 遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素で処理する遺伝子切断試行段階と、上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子に対して、上記 S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて P C R 法を実施する遺伝子増幅試行段階と、増幅された特定のサイズの遺伝子の量を確認する遺伝子増幅量確認段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

【 0 0 1 4 】

上記方法によれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれる S H P 1 遺伝子の切断を試みることでメチル化の有無を区別し、さらに P C R を用いて増幅してから、得られる特定サイズの P C R 産物の量を確認する。それゆえ、検体試料から微量の S H P 1 遺伝子さえ得られれば、S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 1 5 】

上記検出方法においては、上記プライマーが、さらに、配列番号 1 または 2 に示す塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであることが好ましい。

【 0 0 1 6 】

また、上記検出方法においては、上記遺伝子増幅量確認段階では、電気泳動法を用いて特定サイズの遺伝子の量を確認することが好ましい。

【 0 0 1 7 】

さらに、上記検出方法においては、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵

10

20

30

40

50

素として、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素が知られている制限酵素を用いることが好ましい。

【0018】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましい他の一例としては、上記SHP1遺伝子メチル化確認工程に、上記検体試料から得られる遺伝子試料を、重亜硫酸塩で処理する遺伝子修飾段階と、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、SHP1遺伝子の塩基配列中のメチル化シトシンの有無を判定するメチル化シトシン含有判定段階とが含まれる検出方法を挙げることができる。

【0019】

上記方法によれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後のSHP1遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0020】

上記検出方法においては、上記メチル化シトシン含有判定段階では、PCRによりメチル化シトシンを検出する方法、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、またはメチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法による遺伝子の処理のうち、少なくとも何れかが用いられても好ましい。

【0021】

上記方法によれば、少なくともPCRを用いることで、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0022】

上記検出方法においては、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩として、重亜硫酸ナトリウムが用いられることが好ましい。また、上記遺伝子修飾段階では、重亜硫酸塩とともに尿素が併用されてもよい。

【0023】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法であっても、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量すると好ましい。具体的には、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、酵素抗体法（免疫組織化学法、免疫細胞化学法、ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法）またはウエスタンブロッティング法によりSHP1蛋白質が定量されると好ましい。

【0024】

上記方法によれば、抗原抗体反応を利用してSHP1蛋白質を定量することになるので、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0025】

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法においては、上記何れの例の検出方法であっても、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、SHP1mRNAを定量しても好ましい。具体的には、上記SHP1遺伝子産物定量工程では、ノーザンブロッティング法、逆転写PCR法、リアルタイム逆転写PCR法、またはRNA in situハイブリダイゼーション法によりSHP1遺伝子のmRNAの発現が検出されると好ましい。

【0026】

上記方法によれば、SHP1遺伝子産物としてSHP1遺伝子のmRNAによりSHP1遺伝子産物を定量することになるので、SHP1遺伝子のcDNAと相同性を有するオリゴペプチドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで高特異

的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0027】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法の好ましいさらに他の一例としては、異型接合性喪失の有無の確認は、上記SHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方、または、上記SHP1遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型のような遺伝子多型を、PCRを用いたフラグメント解析することにより実施される方法を挙げることができる。このとき用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料であればよい。また、対照としては、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよい、他の正常組織細胞を用いてもよい。

【0028】

上記の方法によれば、マイクロサテライト・マーカまたは単一塩基多型(SNP)等の遺伝子多型の異型接合性喪失をPCRにより確認することによって、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認しているのので、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0029】

本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体、および、(2)シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、SHP1遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するPCR用のプライマーと、上記SHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAとのうち、少なくとも一方を含む構成を挙げることができる。

【0030】

あるいは、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、(1)上記SHP1抗体、および(2)遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および、(3)配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つPCR用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含む構成を挙げることができる。

【0031】

さらには、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましいさらに他の一例としては、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼSHP1遺伝子を挟み込む2つのマイクロサテライト・マーカの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーを含む構成を挙げることができる。

【0032】

上記造血器腫瘍細胞検出キットにおいては、さらに、PCR用試薬、および、制限酵素反応用試薬の少なくとも一方を含むことが好ましい。

【0033】

上記何れの構成であっても、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ迅速に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

【0034】

【発明の実施の形態】

【実施の形態1】

本発明における実施の一形態について図1ないし図24に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0035】

10

20

30

40

50

本発明は、造血器細胞を含む検体試料中に含まれる、造血器細胞に特異的なプロモーターからのプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子産物すなわち S H P 1 蛋白質と m R N A とを定量するとともに、上記検体試料から得られる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認することで、上記検体試料中から造血器腫瘍細胞を検出する技術である。

【 0 0 3 6 】

本発明で、造血器腫瘍細胞を検出するためのマーカーとして用いられる S H P 1 遺伝子は、染色体 1 2 p 1 3 に存在し、図 1 ～図 1 0 および配列番号 1 に示す塩基配列をゲノム D N A (ワイルドタイプ) のセンス鎖とし、図 1 1 ～図 2 0 および配列番号 2 に示す塩基配列をアンチセンス鎖とする 1 6 のエキソン (図および配列表中大文字で示す領域) を有する遺伝子である。その c D N A は、図 2 1 および配列番号 3 に示す塩基配列を有する約 1 . 8 k b のサイズを有している。なお、S H P 1 遺伝子は S H - P T P 1 , P T P 1 C , H C P , H C P H , P T P N 6 , H P T P 1 C , S H P - 1 L と同一の遺伝子である。

10

【 0 0 3 7 】

上記 S H P 1 遺伝子にコードされている S H P 1 蛋白質は、分子量 6 8 k D で、各種造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ (P T P a s e) であり、図 2 2 に示すように、N 末端側にタンデム構造となる 2 つの S H 2 (S r c h o m o l o g y d o m a i n 2) 領域 (2 7 0 アミノ酸残基) と、2 4 6 アミノ酸残基の P T P a s e ドメインと、9 3 アミノ酸残基の C 末端側領域とを有する構造となっている。また、図 2 3 および配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有している。

20

【 0 0 3 8 】

ヒトの造血器腫瘍、例えば悪性リンパ腫や白血病では、多くの種類で 9 0 % 以上の高い頻度で S H P 1 蛋白質の強い発現抑制が見られる (例えば、A m e r i c a n J o u r n a l o f P a t h o l o g y , V o l . 1 5 9 , N o . 4 , O c t o b e r 2 0 0 1 : 1 4 9 5 - 1 5 0 5 等参照)。このように悪性の造血器腫瘍細胞では、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制が極めて高頻度で見られるのに対し、正常な血液細胞にはこの現象が見られない。

【 0 0 3 9 】

本発明者らは、上記 S H P 1 蛋白質の発現抑制が、上記 S H P 1 遺伝子がメチル化されることによる転写異常を原因とすることを独自に見出した。

30

【 0 0 4 0 】

例えば、図 2 4 に示すように、図 1 ～図 1 0 および配列番号 1 に示すゲノム D N A (ワイルドタイプ) のセンス鎖 (1 8 1 塩基 ～ 2 1 6 0 塩基まで例示) において、1 0 0 1 塩基 ～ 1 1 6 3 塩基のエキソン (図中大文字) の前にプロモーター領域が存在するが、この近傍にシトシン (C) とグアニン (G) とが並ぶ C G 配列が多く存在し C p G 島 (C p G i s l a n d) を形成している (図 2 4 中では C G 配列を太字の網掛けで示す)。正常な造血器細胞では、この C p G 島のシトシンはメチル化されていないが、例えば悪性のリンパ腫細胞では、上記 C G 配列のシトシンの多くがメチル化されている。勿論、この C G 配列におけるシトシンのメチル化はセンス鎖のみならずアンチセンス鎖にも同じように生じる。

40

【 0 0 4 1 】

上記 C p G 島における C G 配列の高度なメチル化は、S H P 1 遺伝子の D N A から m R N A の転写を阻害し、その結果、S H P 1 蛋白質の生産が抑制される。この現象は、上述したように造血器腫瘍細胞では極めて高頻度に見られる。しかも、各種造血器腫瘍患者の完全寛解期には、S H P 1 遺伝子における D N A のメチル化が完全に消失し、分子生物学上の知見と臨床上の知見との間に非常に高い相関関係が見られる。それゆえ、メチル化による S H P 1 遺伝子の発現抑制が、造血器腫瘍細胞の発症機構の中で重要な役割を果たしていることが推測される。そこで本発明では、上記 S H P 1 遺伝子の発現抑制という現象を、造血器腫瘍細胞のマーカーとして利用する。

【 0 0 4 2 】

50

さらに、本発明者らは、悪性リンパ腫や白血病等の疾患が発症する際に、上述した、DNAメチル化によってSHP1遺伝子の転写抑制が生じる前後に、SHP1遺伝子の一つの対立遺伝子が喪失することも独自に見出した。そこで、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認することによって、SHP1遺伝子の対立遺伝子の喪失を確認することが可能となる。それゆえ、SHP1遺伝子の異型接合性喪失も造血器腫瘍細胞のマーカーとして利用することができる。

【 0 0 4 3 】

悪性リンパ腫や白血病において、SHP1遺伝子には、高頻度のDNAメチル化、高頻度の異型接合性喪失、SHP1遺伝子の発現の低下または消失が検出され、さらには、外来SHP1遺伝子導入が血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にある。これにより、SHP1 10
遺伝子が癌抑制遺伝子の一つであることが強く示唆される。

【 0 0 4 4 】

そこで、本発明では、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、上記検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認し、SHP1遺伝子産物定量工程にて、造血器細胞を含む検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびmRNAの少なくとも一方を定量し、さらに、SHP1遺伝子LOH確認工程で、SHP1遺伝子の異型接合性喪失を確認するという三つの工程を利用する。これら工程は単独で用いられても良いし、双方ともに用いられても良い。さらに、SHP1遺伝子産物定量工程では、SHP1蛋白質のみ定量されても良いし、SHP1mRNAのみ検出されても良いし、双方ともに検出されてもよい。 20

【 0 0 4 5 】

これによって、例えば、まず、検体試料中のSHP1遺伝子のメチル化を検出することでスクリーニングし、その後、検体試料のSHP1遺伝子産物の発現をSHP1mRNAおよびSHP1蛋白質の少なくとも一方で定量することで、悪性の造血器腫瘍細胞の有無を確認することで造血器腫瘍細胞の存在を確定するという検出プロセスを実施することができる。

【 0 0 4 6 】

したがって、本発明では、SHP1遺伝子の発現を、遺伝子DNAの修飾とmRNAと蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、SHP1遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を3段階で 30
確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。

【 0 0 4 7 】

また、上述したように、本発明におけるSHP1遺伝子を導入することで、血球系の細胞の増殖を抑制する傾向にあることも確認されている。それゆえ、SHP1遺伝子は、遺伝子治療に用いることも可能であり、例えば、腫瘍細胞にSHP1遺伝子の発現ベクターをトランスフェクトすることにより、腫瘍細胞の増殖を抑制することが期待できる。

【 0 0 4 8 】

本発明で用いられる検体試料は、末梢血あるいは骨髓液等の造血器細胞を含む検体試料であればどのような検体試料であっても特に限定されるものではない。本発明における造血器細胞とは、各種血液細胞を含むが、特に好ましくは各種白血球が挙げられる。より具体的には、リンパ球（T細胞・B細胞）、顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）、単球並びにマクロファージ、マスト細胞、ナチュラルキラー細胞等を挙げることができる。あるいは造血幹細胞やリンパ球幹細胞であってもよい。 40

【 0 0 4 9 】

したがって、本発明で用いられる検体試料には、上記造血器細胞が含まれている血液や骨髓液あるいは体液等をヒトから採取し、これをそのまま検体試料として用いてもよいし、採取した血液や体液に対して従来公知の処理を施すことによって、分子生物学的な分析を実施し易い分析用検体試料としてもよい。

【 0 0 5 0 】

本発明が適用可能な造血器腫瘍としては、具体的には、例えば、慢性骨髄性白血病、フィラデルフィア染色体ポジティブ（+（9；22）（q q 3 4；q 1 1），BCR／ABL）慢性骨髄性白血病、慢性好中球白血病、慢性好酸球白血病／高好酸球症候群、慢性突発性骨髄繊維症、真性多血症、本態性血小板増加症、その他分類できない骨髄増殖性疾患等の各種骨髄増殖性疾患；

慢性骨髄性単球白血病、非定型慢性骨髄性白血病、幼年性骨髄性単球白血病等の骨髄異型性／骨髄増殖性疾患；

環状鉄芽球を伴う難治性貧血、環状鉄芽球を伴わない難治性貧血、多系列異形成を伴う難治性血球減少症（骨髄異型性症候群）、過剰芽球5q-症候群を伴う難治性貧血（骨髄異型性症候群）、その他分類できない骨髄異型性症候群等の骨髄異型性症候群；

再発性細胞遺伝学的転座を伴う急性骨髄性白血病（AML）（例えば、+（8；21）（q 2 2；q 2 2）を伴うAML、AML 1（CBF- α ）／ETO、急性前骨髄性白血病（+（15；17）（q 2 2；q 1 1-12）を伴うAMLおよびその変形、PML／RAR- α ）、異常な骨髄好酸球（inv（16）（p 1 3 q 2 2）あるいは+（16；16）（p 1 3；q 1 1）、CBF β ／MYH11X）を伴うAML、11q 2 3（MLL）異常を伴うAML、前骨髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴うAML、前骨髄異型性症候群を伴いかつ多系列異形成を伴わないAML、治療に関係するAMLおよび骨髄異型性症候群（アルキル化剤に関係する治療、エピドフィロトキシンに関係する治療、あるいはその他のタイプの治療）、他に部門に属さないAML（低分化型、成熟を伴わないもの、成熟を伴うもの、急性骨髄性単球白血病、急性単球白血病、急性赤芽球白血病、急性巨核球白血病、急性好塩基球白血病、骨髄繊維症を伴う急性汎骨髄過剰増殖症）、急性二形質性白血病等の急性骨髄性白血病（AML）；

前駆体B細胞性腫瘍（前駆体B-リンパ芽球性白血病／リンパ腫（前駆体B細胞急性リンパ芽球性白血病）、成熟（末梢）B細胞性腫瘍（B細胞慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾辺縁領域B細胞リンパ腫（+／-絨毛リンパ球）、毛状細胞白血病、形質細胞性骨髄腫（形質細胞腫）、MAL T型節外辺縁型B細胞リンパ腫、節性辺縁型B細胞リンパ腫（+／-単球型B細胞）、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大型B細胞リンパ腫（縦隔大細胞B細胞リンパ腫、原発性滲出リンパ腫）、Burkittリンパ腫／Burkitt細胞白血病）等のB細胞性腫瘍；

前駆体T細胞性腫瘍（前駆体T-リンパ芽球性白血病／リンパ腫（前駆体T細胞急性リンパ芽球性白血病）、成熟（末梢）T細胞性腫瘍（T細胞前リンパ球性白血病、T細胞顆粒リンパ球白血病、侵襲型NK細胞白血病、成人T細胞リンパ腫・白血病（HTLV1+）、鼻型節外性NK／T細胞リンパ腫、腸管症型T細胞リンパ腫、肝脾型 γ - δ T細胞リンパ腫、皮下蜂窩織炎様T細胞リンパ腫、菌状息肉腫／Sezary症候群、退形成性大型細胞リンパ腫（T／ヌル細胞、原発性皮膚未分化型）、他に部門に属さない末梢T細胞リンパ腫、血管免疫芽球T細胞リンパ腫）等のT細胞およびNK細胞性腫瘍；

節性リンパ球優勢ホジキンリンパ腫、古典的ホジキンリンパ腫（結節硬化ホジキンリンパ腫（等級1および2）、リンパ球リッチ古典的ホジキンリンパ腫、混合細胞型ホジキンリンパ腫、リンパ球枯渇ホジキンリンパ腫）等のホジキンリンパ腫（ホジキン病）；

等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

【0051】

本発明におけるSHP1遺伝子産物定量工程は、検体試料中のSHP1蛋白質およびSHP1 mRNAの少なくとも一方を定量できる方法であれば特に限定されるものではないが、具体的には、SHP1蛋白質を抗原とするSHP1抗体を用いてSHP1蛋白質を定量する方法（蛋白質定量法）か、SHP1遺伝子のmRNAの発現を検出することにより、SHP1 mRNAを定量する方法（mRNA定量法）を好適に用いることができる。

【0052】

まず、上記蛋白質定量法のより具体的な手法としては、SHP1抗体を用いたウエスタンブロッティング法または酵素抗体法（Immunochemistry）（免疫組織化学

10

20

30

40

50

法、免疫細胞化学法、E L I S A (e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) 法) を挙げることができる。

【 0 0 5 3 】

上記蛋白質定量法で用いられるSHP1抗体は、図22、図23および配列番号4に示す構造を有するSHP1蛋白質の少なくとも一部の構造を抗原決定基として認識し、SHP1蛋白質を免疫学的に確実に検出できる抗体であれば特に限定されるものではなく、ポリクローナル抗体であってもよいし、モノクローナル抗体であってもよい。

【 0 0 5 4 】

上記SHP1抗体は、従来公知の方法で製造してもよいし、市販のSHP1抗体を用いてもよい。SHP1抗体の製造方法としては、例えば、モノクローナル抗体であれば、SHP1蛋白質で免疫したマウス脾臓リンパ球とマウスの骨髄細胞とを融合させてなるハイブリドーマにより産生する手法が挙げられる。また、上記SHP1抗体がポリクローナル抗体であれば、SHP1蛋白質で免疫したウサギの免疫血清から精製する手法が挙げられる。また、市販のSHP1抗体としては、#SH-PTP1(D-11):sc7289および#SH-PTP1(C-19):sc287(Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)、#anti SHPTP(06117)および#anti mouse SHPTP(05281) (Upstate Biotechnology Inc. 製) 等が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

上記SHP1抗体を用いた酵素抗体法(免疫組織化学法、免疫細胞化学法、ELISA法)は、従来公知の方法(例えば、『酵素抗体法』渡辺慶一・中根一穂編集、学際企画出版(昭和61年)や、Brown R. W. et al: Modern Pathol. 199; 8(5):515-20(1995)等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【 0 0 5 6 】

同様に、上記SHP1抗体を用いたウエスタンブロッティング法も、従来公知の方法(例えば、『実験操作ブロッティング法』日野嘉幸他編、ソフトサイエンス社(昭和62年)や、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, (1979) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【 0 0 5 7 】

上記蛋白質定量法を用いることで、抗原抗体反応を利用してSHP1蛋白質を定量することになる。そのため、簡素なメカニズムで高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 5 8 】

次に、上記mRNA定量法のより具体的な手法としては、配列番号3(図21参照)に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出する方法が挙げられ、より具体的には、ノーザンブロッティング法、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(RT-PCR)、リアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法(real time RT-PCR)、またはRNA in situハイブリダイゼーションを挙げることができる。

【 0 0 5 9 】

上記ノーザンブロッティング法、RT-PCR、real time RT-PCR、およびRNA in situハイブリダイゼーションの何れの方法も従来公知の方法(例えば、"Molecular cloning" a laboratory manual, Sambrook J., Russell DW., Cold Spring Harbor Lab Press. (2001)や、"Current protocols in molecular biology" edited by Ausubel FM et al., John Wiley & Sons Inc. (2000)等)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

001) 等の文献に開示されている方法)を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【0060】

上記ノーザンブロッティング法やRNA in situ ハイブリダイゼーションでは、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの全長あるいはその一部をプローブとして用いることができる。また、RT-PCRやreal time RT-PCRでも、原理的には、配列番号3に示すSHP1遺伝子のcDNAの一部と相同性を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることができる。具体的には、例えば、後述する実施例3や実施例4に示すプライマーペアを用いることができる。

【0061】

それゆえ、mRNA定量法では、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を有するポリヌクレオチドを用いてSHP1遺伝子のmRNAの発現を検出すればよい。

10

【0062】

上記mRNA定量法を用いることで、SHP1遺伝子の転写産物であるSHP1mRNAを定量することになるので、SHP1遺伝子のcDNAと相同性を有するポリヌクレオチドをプローブやプライマーとして利用することで、簡素なメカニズムで迅速、高特異的かつ高感度に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0063】

本発明におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程は、検体試料から得られるSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認できる方法であれば特に限定されるものではないが、本実施の形態では、例えば、遺伝子切断試行段階と、遺伝子増幅試行段階と、遺伝子増幅量確認段階とを含むメチル化感受性制限酵素を利用した方法(以下、説明の便宜上、制限酵素確認法と称する)を好適に用いることができる。

20

【0064】

本実施の形態で用いられるメチル化感受性制限酵素とは、二本鎖DNAにおいて認識対象となる塩基配列にシトシンを含んでおり、かつ、この塩基配列中のシトシンがメチル化された場合には、該塩基配列の二本鎖DNAを切断できない制限酵素であれば特に限定されるものではない。

【0065】

上記メチル化感受性制限酵素としては、具体的には、例えば、HpaII、EagIまたはNaeI等を挙げることができる。中でも、HpaIIをより好ましく用いることができる。HpaIIは、CCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNA切断するエンドヌクレアーゼであるが、同じ塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断する制限酵素として、MspIが知られている。

30

【0066】

上述したように、HpaIIはメチル化されたCCGGの塩基配列の二本鎖DNAを切断できないが、MspIはメチル化の有無に関わらずCCGGの塩基配列を認識して二本鎖DNAを切断することが可能である。すなわち、MspIはメチル化非感受性制限酵素である。それゆえ、HspIIとMspIとを併用することで、後述するように、検体試料中のSHP1遺伝子の切断を確実に確認するためのコントロールとして利用することが可能になり、本実施の形態における制限酵素確認法の信頼性をより一層向上させることができる。

40

【0067】

このように、本実施の形態における制限酵素確認法では、使用するメチル化感受性制限酵素と同じ塩基配列を認識するメチル化非感受性制限酵素をコントロールとして使用することが好ましい。勿論、メチル化感受性およびメチル化非感受性制限酵素の組み合わせは上記HspII・MspIに限定されるものではないことは言うまでもない。

【0068】

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程、すなわち制限酵素確認法

50

による S H P 1 遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

【 0 0 6 9 】

まず、遺伝子切断試行段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を、シトシンを含む塩基配列を認識する上記メチル化感受性制限酵素で処理する。この段階では、メチル化感受性制限酵素の処理により遺伝子試料中に含まれる S H P 1 遺伝子の切断を試みる。すなわち、前記検体試料中に含まれる造血器細胞が正常な細胞のみであれば、S H P 1 遺伝子は切断されるが、造血器腫瘍細胞が含まれていれば、S H P 1 遺伝子は C G 配列がメチル化されているため切断されない。

【 0 0 7 0 】

前記検体試料から遺伝子試料を調製する方法は従来公知の方法を用いることができ特に限定されるものではない。また、調製された遺伝子試料は、S H P 1 遺伝子を含んでいればよく、制限酵素処理や P C R 等を阻害しない限り他の成分が含まれていても良い。それゆえ、前記検体試料中に含まれる造血器細胞やその他の細胞から抽出される各種 D N A や R N A の混合物であればよい。また、メチル化感受性制限酵素による処理についても特に限定されるものではなく、該メチル化感受性制限酵素の種類や調製された遺伝子試料の状態等に応じて、適宜条件等を設定すればよい。

【 0 0 7 1 】

次に、遺伝子増幅試行段階として、上記メチル化感受性制限酵素で処理された遺伝子試料に対して、上記 S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識切断される塩基配列を含む領域を増幅するプライマーを用いて、P C R を実施する。この段階では、メチル化感受性制限酵素で処理した制限酵素処理物を、上記プライマーを用いて P C R 処理することにより、S H P 1 遺伝子のみの増幅を試みる。正常な S H P 1 遺伝子のみであれば、プライマーペアに挟まれる領域が切断されているため S H P 1 遺伝子は増幅できないが、メチル化されている S H P 1 遺伝子が含まれていれば、上記プライマーペアに挟まれる領域は切断されていないため S H P 1 遺伝子が増幅される。

【 0 0 7 2 】

上記遺伝子増幅試行段階で用いられる上記プライマーとしては、メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅するポリヌクレオチドであればよい。それゆえプライマーの設計条件等についても特に限定されるものではない。基本的には、本実施の形態で用いられるプライマーペアは、メチル化感受性制限酵素に認識される上記塩基配列を含む領域の少なくとも外側に位置し、配列番号 1 または 2 (図 1 ~ 図 1 0 および図 1 1 ~ 図 2 0 参照) に示す S H P 1 遺伝子の塩基配列に含まれる部分塩基配列、またはこの部分塩基配列と相補性を有するポリヌクレオチドであればよく、その場所やサイズ等については特に限定されるものではない。

【 0 0 7 3 】

次に、遺伝子増幅量確認段階として、増幅された遺伝子の量を確認する。この段階では、S H P 1 遺伝子が増幅されたか否かを確認する。S H P 1 遺伝子が増幅されれば、元の検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

【 0 0 7 4 】

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられる S H P 1 遺伝子の有無の確認方法としては特に限定されるものではないが、電気泳動法を用いてマーカーと比較することにより遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングして検出してもよい。

【 0 0 7 5 】

上記遺伝子増幅量確認段階で用いられる S H P 1 遺伝子の有無の確認方法としては特に限定されるものではないが、検体試料と同時にメチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A を用いて反応を行った後電気泳動法を用いて遺伝子の増幅量を確認する手法が最も一般的で確立された手法であるため好ましく用いることができる。また、電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングして検出してもよい。

【 0 0 7 6 】

上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A は、S H P 1 遺伝子を用いたものであればよく、特に限定されるものではない。具体的には、メチル化感受性制限酵素またはメチル化非感受性制限酵素により処理することで得られる、増幅量を比較できる程度の濃度を有する D N A 溶液を挙げることができる。

【 0 0 7 7 】

さらに、制限酵素確認法による S H P 1 遺伝子メチル化確認工程では、コントロールとして、メチル化感受性制限酵素による処理と並行して、同一の検体試料をメチル化非感受性制限酵素で処理して、それを遺伝子増幅量確認段階で確認すると好ましい。すなわち、上記遺伝子切断試行段階では、メチル化感受性制限酵素として、同一の塩基配列を認識するメチル化非感受制限酵素が知られている制限酵素を用いることが非常に好ましい。これによって、制限酵素確認法による S H P 1 遺伝子のメチル化の確実性を高めることができる。

【 0 0 7 8 】

本発明における S H P 1 サテライト L O H 確認工程は、造血器細胞を含む検体試料において、この検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失 (L o s s o f h e t e r o z y g o s i t y , L O H と略す) の有無を確認することができる方法であれば特に限定されるものではないが、具体的には、S H P 1 遺伝子を挟み込むマイクロサテライト・マーカー、または、上記 S H P 1 遺伝子中か、その近辺に存在する単一塩基多型 (s i n g l e n u c l e o t i d e p o l y m o r p h i s m , S N P) のような遺伝子多型 (p o l y m o r p h i s m) について、P C R を用いたフラグメント解析によって L O H を確認する方法を好適に用いることができる。

【 0 0 7 9 】

上記 S H P 1 遺伝子の両側に存在するマイクロサテライト・マーカーや、S H P 1 遺伝子中またはその近辺に存在する遺伝子多型については、特に限定されるものではなく、どのようなマーカーを用いてもよいが、具体的には、例えば、D 1 2 S 3 3 6 マーカーおよび D 1 2 S 3 5 6 マーカーを挙げることができる。これらマーカーの塩基配列は、インターネット・ゲノム・データベース (U R L : h t t p : / / g d b w w w . g d b . o r g . /) から得られる。これらマーカーのうち、D 1 2 S 3 5 6 マーカーはテロメア側に存在し、S H P 1 遺伝子から約 4 . 4 c M の距離にある。一方、D 1 2 S 3 3 6 マーカーはセントロメア側に存在し、S H P 1 遺伝子から約 2 . 4 c M の距離にある。

【 0 0 8 0 】

検体試料における S H P 1 遺伝子の L O H (異型接合性喪失) の確認に際しては、S H P 1 サテライト L O H 確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料となっていればよい。また、L O H の具体的な方法は特に限定されるものではないが、後述する実施例 6 に示すように、P C R 反応によって上記各マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出するマイクロサテライト解析を行えばよい。このときの P C R 反応他の条件も特に限定されるものではなく、P C R 用のプライマーとしては、例えば、D 1 2 S 3 3 6 マーカーまたは D 1 2 S 3 5 6 マーカーの少なくとも一部を検出できるようなプライマーであればよく、その他の条件についても適切な条件を適宜設定すればよい。

【 0 0 8 1 】

本発明における S H P 1 サテライト L O H 確認工程で用いられる検体試料は、造血器細胞を含む検体試料であれば特に限定されるものではない。また、対照として用いる検体試料も特に限定されるものではなく、血液学的完全寛解後に得られる検体を用いてもよいし、他の正常組織細胞を用いてもよい。

【 0 0 8 2 】

このように、マイクロサテライト・マーカーや S N P 等の遺伝子多型を利用して S H P 1 遺伝子の L O H を確認することで、簡素なメカニズムでより確実に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 0 8 3 】

なお、本実施の形態では、SHP1遺伝子のLOHを、マイクロサテライト・マーカーや遺伝子多型を利用して確認した例を挙げているが、本発明はこれに限定されるものではなく、SHP1遺伝子のLOHが確認できる方法であればどのような方法でもよいことは言うまでもない。

【0084】

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

【0085】

まず、SHP1遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれるSHP1蛋白質およびSHP1 mRNAの少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量されたSHP1蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんどSHP1遺伝子産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

【0086】

次に、SHP1遺伝子メチル化確認工程で、前記制限酵素確認法により、検体試料から調製した遺伝子試料中のSHP1遺伝子の塩基配列中に含まれるCpG島のメチル化を確認する。以下の説明では、メチル化感受性制限酵素として前記HpaIIを用いた例を挙げる。HpaIIは、前述したようにCCGGの塩基配列を認識するが、同じ塩基配列を、メチル化非感受性制限酵素MspIも認識するため、好ましく用いられる。

【0087】

そこで、遺伝子切断試行段階では、上記検体試料から得られた遺伝子試料を、HpaIIで処理する。同時に、同一の遺伝子試料をMspIで処理すると好ましい。これによって、CCGG塩基配列が切断されるというポジティブコントロールを得ることができる。

【0088】

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、先に、SHP1遺伝子の塩基配列（配列番号1および2、図1～図10および図11～図20参照）から、HpaII/MspIの認識部位（CCGG）を挟んでPCR用のプライマーを設定する。具体的には、例えば、後述する実施例1や実施例2に示すプライマーペアを用いる。

【0089】

上記のようなプライマーを用いて、HpaIIで処理された遺伝子試料に対してPCRを実施し、遺伝子増幅量確認段階で、例えば電気泳動によりPCR産物の増幅量を確認する。遺伝子試料中に、メチル化されたSHP1遺伝子があれば、HpaIIは切断できないので、PCRにより目的のサイズのPCR産物が検出できる。一方、メチル化されたSHP1遺伝子が無ければ、HpaIIによりDNAが切断されPCR産物は検出できない。

【0090】

このように、上記制限酵素確認法を用いれば、メチル化感受性制限酵素を用いて検体試料から得られた遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の切断を試み、さらにPCRを用いて増幅してから、得られるPCR産物の増幅量を確認することができる。それゆえ、検体試料から微量のSHP1遺伝子さえ得られれば、SHP1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても迅速に高い検出感度で、しかも高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【0091】

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、他の工程（プロセス）や他の段階（ステップ）が含まれていてもよいことは言うまでも無い。例えば、SHP1遺伝子メチル化確認工程において、制限酵素反応やPCR反応を円滑に進めるために、得られた遺伝子試料等を精製する精製段階が含まれていてもよい。

【0092】

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための検出キットが含まれる。具体的には、前記SHP1抗体、前記メチル化感受性制限酵素、前記各プライマー、前記SHP1遺伝子陽性およびメチル化陰性対照DNA等を含む構成

を挙げることができる。特に、(1) 上記 S H P 1 抗体、および (2) メチル化感受性制限酵素と、P C R 用プライマーと、前記 S H P 1 遺伝子陽性およびメチル化陰性対照 D N A との組み合わせに分けた場合には、(1) および (2) の少なくとも一方が含まれていると好ましい。また、S H P 1 遺伝子産物定量工程と S H P 1 遺伝子メチル化確認工程の順番はどちらが先であっても良い。

【 0 0 9 3 】

さらに、上記検出キットには、必要に応じて、他の各種試薬類が含まれていてもよい。例えば、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等の P C R 反応用試薬、および、バッファー等の制限酵素反応用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

【 0 0 9 4 】

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、蛋白質定量法の場合、酵素抗体法およびウエスタンブロッティング法の何れであっても、S H P 1 抗体およびその検出試薬が少なくとも用いられる。また、m R N A 定量法の場合、R T - P C R 法や r e a l t i m e R T - P C R 法を用いる場合、S H P 1 c D N A 検出用プライマーおよび T a q D N A ポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。

【 0 0 9 5 】

次に、本実施の形態における S H P 1 遺伝子メチル化確認工程では、メチル化感受性制限酵素によりメチル化を確認するため、まず、遺伝子切断試行段階にて、メチル化感受性制限酵素、メチル化非感受性制限酵素、およびこれらの反応試薬が少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅試行段階では、プライマー、T a q D N A ポリメラーゼ反応試薬、システム検討用 S H P 1 遺伝子メチル化陽性 D N A が少なくとも用いられる。次に、遺伝子増幅量確認段階では、S H P 1 遺伝子メチル化陽性およびメチル化陰性対照 D N A を用いた反応産物を電気泳動のコントロールとして少なくとも使用することができる。

【 0 0 9 6 】

このように、本発明にかかる検出キットでは、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

【 0 0 9 7 】

〔実施の形態 2〕

本発明における実施の他の形態について図 2 5 ないし図 4 7 に基づいて説明すれば以下の通りである。なお、本発明はこれに限定されるものではない。また、説明の便宜上、実施の形態 1 と重複する説明は適宜省略する。

【 0 0 9 8 】

前記実施の形態 1 では、S H P 1 遺伝子メチル化確認工程に、メチル化感受性制限酵素を用いる制限酵素確認法を用いたが、本発明は、これに限定されるものではなく、本実施の形態では、例えば、遺伝子修飾段階とメチル化シトシン含有判定段階とを含む、重亜硫酸塩を用いて D N A を修飾する方法（以下、説明の便宜上、D N A 修飾法と称する）を好適に用いることができる。

【 0 0 9 9 】

D N A を重亜硫酸塩 (B i s u l f i t e) で処理すると、シトシンはウラシルに変換される。具体的には、図 2 5 に示すように、シトシンが重亜硫酸塩によりスルホン化 (S u l p h o n a t i o n) され、さらに加水分解により脱アミノ化 (H y d r o l y t i c d e a m i n a t i o n) され、さらに、アルカリ存在下での脱スルホン化 (A l k a l i d e s u l p h o n a t i o n) により、ウラシルに変換される。このウラシルは P C R 後、チミンに置き変わる。これに対して、メチル化されたシトシン (5 ' - メチルシトシン) は重亜硫酸塩によって変換されない。そこで、本実施の形態では、この重亜硫酸塩処理後の塩基配列の違いを利用して、後述するように、S H P 1 遺伝子のメチル化の有無を検出する。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 0 】

次に、本実施の形態における S H P 1 遺伝子メチル化確認工程、すなわち D N A 修飾法による S H P 1 遺伝子のメチル化の確認について具体的に説明する。

【 0 1 0 1 】

まず、遺伝子修飾段階として、造血器細胞を含む前記検体試料から得られた遺伝子試料を重亜硫酸塩で処理する。この段階では、上述したように、メチル化されていないシトシンのみがウラシルに変換されるので、例えば、それゆえ、D N A を重亜硫酸塩処理すると、図 2 6 に示すように、メチル化された（図中円で囲んだ M で示す）シトシンはシトシンのままで残存するが、メチル化されていないシトシンはウラシル（U）に変換される。

【 0 1 0 2 】

上記遺伝子修飾段階で用いられる重亜硫酸塩としては、特に限定されるものではないが、例えば、重亜硫酸ナトリウム（ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 、メタ重亜硫酸ナトリウム、二亜硫酸ナトリウムまたはピロ亜硫酸ナトリウムともいう）を好適に用いることができる。さらに、重亜硫酸化合物とともに尿素が併用されてもよい。

【 0 1 0 3 】

次に、メチル化シトシン含有判定段階として、重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる、S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する。重亜硫酸塩処理物中の S H P 1 遺伝子にシトシンが含まれているということは、処理前の S H P 1 遺伝子には、メチル化されたシトシンが含まれていることになる。それゆえ、シトシンが存在すれば、元の検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれていることになる。

【 0 1 0 4 】

上記メチル化シトシン含有判定段階で実施される、S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無を判定する方法としては特に限定されるものではないが、具体的には、1）メチル化シトシンを P C R により検出する方法、2）メチル化シトシンを遺伝子の塩基配列の決定により検出する方法、または、3）メチル化シトシンを含む塩基配列を識別する方法のうち、少なくとも何れかの手法を好ましく用いることができる。

【 0 1 0 5 】

より具体的には、まず、1）メチル化シトシンを P C R により検出する方法としては、メチル化特異的 P C R（M e t h y l a t i o n S p e c i f i c P C R）を挙げることができる。

【 0 1 0 6 】

上記メチル化特異的 P C R 法は、メチル化された D N A に特異的かつ C G 配列を含む塩基配列をプライマーとして設定する。メチル化されたシトシンが存在していれば P C R により増幅が可能となり、それゆえメチル化された S H P 1 遺伝子を検出することができる。

【 0 1 0 7 】

上記メチル化特異的 P C R 法は、従来公知の方法（例えば、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 93, 9821-9826, (1996) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、D N A の精製過程ではエタノール沈澱法や G l a s s b e a d s 法を用いた方法等を用いることができ、また、蛍光ラベルしたプライマーを用いれば、P C R の検出を容易にすることができる。

【 0 1 0 8 】

次に、2）遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、すなわち S H P 1 遺伝子のシーケンシングでは、C G 配列を含まない領域にプライマーを設定し P C R を実施する。得られる P C R 産物の中には、メチル化をされているもの（C G 配列のままで存在）とメチル化されていないもの（T G 配列に変換されている）が含まれている可能性がある。これをシーケンシングすることにより、C G 配列すなわちメチル化の存在を検討する。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

40

50

上記 S H P 1 遺伝子のシークエンシングも、従来公知の方法（例えば、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 89, 1827-1831 (1992) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。なお、上記プライマーとしては、メチル化された D N A に特異的な配列（C G 配列を含む）を有するプライマーを用いることも可能である。

【 0 1 1 0 】

この方法も P C R を用いているので、検体試料から微量の S H P 1 遺伝子さえ得られれば、S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。また、シークエンシングを利用することにより具体的な配列を決定するので、メチル化の程度をより明確化することも可能となる。

【 0 1 1 1 】

次に、3) シトシンを含む塩基配列を識別する方法としては、M s - S n u P E 法、重亜硫酸塩 S S C P 法、メチルライト法、蛍光溶解曲線分析法、C O B R A 法等を挙げることができる。

【 0 1 1 2 】

上記 M s - S n u P E (M e t h y l a t i o n - s e n s i t i v e S i n g l e N u c l e o t i d e P r i m e r E x t e n s i o n) 法は、メチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法である。ただし、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らないので、検出したい C G 配列に隣接するポリヌクレオチドを作成し P C R 産物とアニールさせる。放射性同位元素の存在下で D N A を合成した時に、 ^{32}P -d C T P を取り込めば、そこは C G 配列であるためメチル化されているシトシンが存在することになる。一方、D N A を合成した時に、 ^{32}P -d T T P を取り込めば、そこは T G 配列であるためメチル化はされていなかったことになる。

【 0 1 1 3 】

上記 M s - S n u P E 法は、従来公知の方法（例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 25, 2529-2531, (1997) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【 0 1 1 4 】

上記重亜硫酸塩 S S C P (B i s u l f i t e - S S C P) 法も、メチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、P C R 産物を 1 本鎖 D N A に変性後、S S C P (S i n g l e S t r a n d C o n f o r m a t i o n a l P o l y m o r p h i s m) 法を用いて電気泳動し、1 本鎖 D N A の移動度の違いから、S H P 1 遺伝子のメチル化の程度を判定する。

【 0 1 1 5 】

上記重亜硫酸塩 S S C P 法も、従来公知の方法（例えば、E l e c t r o p h o r e s i s 21, 904-908, (2000) 等の文献に開示されている方法）を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。

【 0 1 1 6 】

他に、メチルライト (M e t h y l - l i g h t) 法や、蛍光溶解曲線分析 (F l u o r e s c e n c e M e l t i n g C u r v e A n a l y s i s) 法等も挙げられる。これら方法も、何れもメチル化された D N A に特異的なプライマーを用いて P C R を実施する方法であるが、プライマーに挟まれた領域でのメチル化の有無が判らない。そこで、内側の調べたい領域について、メチル化特異的なポリヌクレオチドを作成し、このメチル化特異的ポリヌクレオチドが 1 本鎖にした P C R 産物とどの程度アニール (2 本鎖重合) 反応するかを検討することにより、上記 P C R 産物中のメチル化の量を判定する。

【 0 1 1 7 】

上記メチルライト法は、具体的には、例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 28 (8) , E 3 2 , (2 0 0 0) 等の文献に開示されている方法を、上記蛍光溶解曲線分析は、具体的には、例えば、C l i n i c a l C h e m i s t r y 47 , 1 1 8 3 - 1 1 8 9 , (2 0 0 1) 等の文献に開示されている方法を好適に用いることができる。

【 0 1 1 8 】

上述した各方法は、P C Rを用いているので、検体試料から微量のS H P 1遺伝子さえ得られれば、S H P 1遺伝子のメチル化を検出することが可能である。そのため、検体試料中に造血器腫瘍細胞がごく微量しか存在していなくても高い検出感度で高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 1 1 9 】

上記C O B R A法 (C o m b i n e d B i s u l f i t e R e s t r i c t i o n A n a l y s i s、あるいは、B i s u l f i t e P C R f o l l o w e d b y r e s t r i c t i o n a n a l y s i s等とも称される) では、例えば、C G C G配列がメチル化を受けていると、重亜硫酸処理後もC G C G配列のままに残存するが、メチル化されていないとT G T G配列に変換される。そこで、上記C G C G配列のみを切断する制限酵素等を利用することで、電気泳動ゲル上のバンドパターンを解析して、S H P 1遺伝子のメチル化の有無を判定および定量化することができる。

【 0 1 2 0 】

上記C O B R A法も、従来公知の方法 (例えば、N u c l e i c A c i d s R e s e a r c h 25 , 2 5 3 2 - 2 5 3 4 , (1 9 9 7) 等の文献に開示されている方法) を好適に用いることができ、その具体的な工程や試薬類、条件等は特に限定されるものではない。勿論、この方法でもP C Rが用いられるので、上述したP C Rによる利点を得られるだけでなく、制限酵素処理と電気泳動とを用いるので、バンドパターンの解析さえ明確化しておれば、容易にS H P 1遺伝子のメチル化を確認することができるという利点もある。

【 0 1 2 1 】

このように、本実施の形態におけるD N A修飾法では、メチル化シトシン含有判定段階でP C Rを用いているが、このP C Rで用いるプライマーの設計方法について以下に説明する。

【 0 1 2 2 】

上述したように、D N Aを重亜硫酸塩処理するとシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されずに保存される。ここで、細胞内でメチル化を受ける可能性のあるシトシンは、5'配列側からC Gと並ぶC G配列 (5' - C G - 3') のシトシン (C) のみである。そのため、重亜硫酸塩処理により、上記C G配列以外のシトシンは全てチミン (T) に変換されてしまう。そこで、全てのC G配列がメチル化を受けたものとしてS H P 1遺伝子の塩基配列を変換し、プライマーを設定する。なお、D N A中のウラシルはチミンとして認識され、P C Rによりチミンに置換されることになる。

【 0 1 2 3 】

まず、プライマーを計画するD N A鎖に関する条件を設定する。S H P 1遺伝子の塩基配列において、センス鎖またはアンチセンス鎖の何れも、上記C G配列のみがメチル化を受けたとして、その他の塩基配列におけるシトシンが全てチミンに変換された配列を想定する。

【 0 1 2 4 】

具体的には、図27～図36および配列番号5に示す塩基配列が、図1～図10および配列番号1に示すS H P 1遺伝子のゲノムD N A (ワイルドタイプ) のセンス鎖に対応する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列 (以下、説明の便宜上、センス鎖変換配列とする) であり、図37～図46および配列番号6に示す塩基配列が、図11～図20および配列番号2に示すS H P 1遺伝子のゲノムD N A (ワイルドタイプ) のアンチセンス鎖と対応

する、重亜硫酸塩処理後の塩基配列（以下、説明の便宜上、アンチセンス鎖変換配列とする）である。これらセンス鎖変換配列とアンチセンス鎖変換配列とは、重亜硫酸塩処理により相補的ではなくなる。

【 0 1 2 5 】

なお、図 2 7 ～ 図 3 6 および配列番号 5、並びに、図 3 7 ～ 図 4 6 および配列番号 6 の塩基配列は、C G 配列が 1 0 0 % メチル化されていると想定した場合に、重亜硫酸塩処理を受けたものとしての塩基配列であり、実際には細胞中で 1 0 0 % のメチル化が生じるとは考えられないため、本発明において検出し得る可能性としての塩基配列として例示する。

【 0 1 2 6 】

そして、(I) 上記センス鎖変換配列に対して、フォワードプライマー (F W プライマー) およびリバースプライマー (R V プライマー) を作成するか、あるいは、(I I) 上記アンチセンス鎖変換配列に対して、F W プライマーおよび R V プライマーを作成する。この場合、同じ場所でもプライマー配列はそれぞれ異なる。 10

【 0 1 2 7 】

次に、プライマーを計画する領域に関する条件を設定する。(i) メチル化された D N A のみを直接 P C R で増幅するために、C G 配列を含む塩基配列に対してプライマーを作成するか、(i i) メチル化されたもの、されていないものを区別なく P C R で増幅するために、C G 領域を含まない配列に対してプライマーを作成する。なお、(i i) の場合は、後でシーケンシングかその他の方法を実施し、メチル化を判定する。

【 0 1 2 8 】

したがって、D N A 修飾法で用いられるプライマーの設計には、上記 D N A 鎖に関する条件 (I) および条件 (I I) と、領域に関する条件 (i) および条件 (i i) とを掛け合わせた 4 通りの設計方法がある。 20

【 0 1 2 9 】

ここで、(i) の場合、プライマーの場所が都合良くメチル化を受けていれば検出されるが、その場所ではなく近隣領域のみメチル化を受けているような場合には、メチル化が存在するのにも関わらず検出不可能となる。そこで、(i i) のように、メチル化の有無に関わらず P C R で増幅後、各プライマーに囲まれた領域内のメチル化、すなわち C G 配列の有無を検定することで、確実に S H P 1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、本実施の形態における S H P 1 遺伝子のメチル化の判定には、検出用のプライマーの場所のみならず、遺伝子配列の情報そのものが重要となる。 30

【 0 1 3 0 】

また、C G 配列がメチル化されていないと、重亜硫酸塩処理により T G 配列に変換されるが、この T G 配列を含む塩基配列に対して作成されるプライマー (U n m e t h y l a t e d p r i m e r) は、メチル化を受けていない D N A の存在を証明するコントロールとして用いることができる。また、重亜硫酸塩処理が不十分な場合には、シトシンがウラシルに変換されていないワイルドタイプの S H P 1 遺伝子が混入することになる。そこで、重亜硫酸塩処理が十分完全になされたか否かのコントロールとして、ワイルドタイプの塩基配列を有するプライマー (W i l d t y p e p r i m e r) を用いることができる。 40

【 0 1 3 1 】

なお、上述したメチル化シトシン含有判定段階では、P C R により増幅された遺伝子の確認に、前記実施の形態 1 における遺伝子増幅量確認段階と同様の方法、例えば、電気泳動法を用いてマーカと比較することにより遺伝子の増幅量を確認したり、さらに電気泳動後に得られた D N A バンドをメンブレンにブロッティングしたりする手法が挙げられる。勿論、これら手法に限定されるものではなく、また、上記電気泳動法やブロッティングの方法についても従来公知の手法を好適に用いることができ、特に限定されるものではない。

【 0 1 3 2 】

換言すれば、本実施の形態における D N A 修飾法による S H P 1 遺伝子メチル化確認工程 50

でも、前記実施の形態 1 における制限酵素確認法による場合と同様、遺伝子増幅量確認段階が含まれていても良い。

【 0 1 3 3 】

次に、本実施の形態にかかる検出方法の好ましい一例について、より具体的に説明する。

【 0 1 3 4 】

まず、SHP1 遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれる SHP1 蛋白質および SHP1 mRNA の少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量された SHP1 蛋白質が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんど SHP1 遺伝子産物が発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

10

【 0 1 3 5 】

次に、SHP1 遺伝子メチル化確認工程で、前記 DNA 修飾法により、検体試料から調製した遺伝子試料中の SHP1 遺伝子の塩基配列中に含まれる CpG 島のメチル化を確認する。具体的には、遺伝子修飾段階にて、例えば重亜硫酸ナトリウムを用いて、上記検体試料から得られた遺伝子試料をで処理する。

【 0 1 3 6 】

次に、遺伝子増幅試行段階に移行するが、このステップでは、前述したプライマーの設計方法に基づいて、PCR 用のプライマーを設定する。

【 0 1 3 7 】

具体的には、メチル化特異的 PCR では、図 47 (a) に示すように、例えば、23 塩基対のワイルドタイプ DNA (図中上がセンス鎖で下がアンチセンス鎖) を想定し、ワイルドタイプ DNA の CG 配列に 100% メチル化があるとする。この場合、重亜硫酸塩処理すると、図 47 (b) に示すように、センス鎖とアンチセンス鎖は相補的ではなくなる。そこで、図 47 (c) または (d) に示すように、センス鎖またはアンチセンス鎖に対して FW プライマーおよび RV プライマーを作成する。

20

【 0 1 3 8 】

なお、上記メチル化特定 PCR においては、PCR 用プライマーとして、具体的には、例えば、後述する実施例 4 や実施例 5 に示すプライマーペアを用いる。上記のようなプライマーを用いて、重亜硫酸ナトリウムで処理された遺伝子試料に対してメチル化特異的 PCR を実施し、例えば電気泳動により PCR 産物の増幅量を確認する。

30

【 0 1 3 9 】

このように、上記 DNA 修飾法を用いれば、重亜硫酸塩を用いて検体試料から得られた遺伝子試料を処理すると、塩基配列中のシトシンはウラシルに変換されるが、メチル化されたシトシンは変換されない。そのため、遺伝子修飾段階後の SHP1 遺伝子の塩基配列中にシトシンが含まれるか否かを判定するのみで、SHP1 遺伝子のメチル化を検出することができる。そのため、単純なメカニズムで迅速かつ高特異的に造血器腫瘍細胞を検出することが可能となる。

【 0 1 4 0 】

次に、SHP1 遺伝子産物定量工程により、前述した手法を用いて検体試料中に含まれる SHP1 蛋白質および SHP1 mRNA の少なくとも一方を定量する。このプロセスで定量された SHP1 遺伝子産物が、標準よりも大幅に減少していたり、ほとんど発現していなかったりした場合には、検体試料中に造血器腫瘍細胞が含まれている可能性が高くなる。

40

【 0 1 4 1 】

なお、本実施の形態で説明した上記検出方法には、前記実施の形態 1 の検出方法と同様に、他の工程 (プロセス) や他の段階 (ステップ) が含まれていてもよいことは言うまでも無い。

【 0 1 4 2 】

本発明には、上述した造血器腫瘍細胞検出方法だけでなく、該検出方法を実施するための検出キットが含まれる。具体的には、遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と前記

50

プライマー、および前記SHP1抗体を含む構成を挙げることができる。つまり、本発明にかかる検出キットでは、上記重亜硫酸塩、プライマー、およびSHP1抗体を、(1) 上記SHP1抗体、(2) 重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれるSHP1遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および(3) 配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部を検出するPCR用のプライマーに分けた場合、(1)、(2)および(3)のうち、少なくとも何れか一つを含むことが好ましい。

【0143】

さらに、上記検出キットには、配列番号3に示すSHP1遺伝子cDNAの塩基配列の全長またはその一部と相同性を持つノーザンブロッティング用プローブ、または、シトシンを含む塩基配列を認識する制限酵素およびSHP1遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照DNAを用いた電気泳動用マーカーが含まれていてもよく、さらには、ヌクレオチドモノマー、ポリメラーゼ、バッファー等のPCR反应用試薬、および、バッファー等の制限酵素反应用試薬の少なくとも一方が含まれていてもよい。

【0144】

より具体的に、各工程または段階ごとに用いられる試薬等について説明する。まず、遺伝子産物定量工程では、前記実施の形態1で例に挙げたものと同様であるのでその説明は省略する。

【0145】

次に、本実施の形態におけるSHP1遺伝子メチル化確認工程では、重亜硫酸塩処理によりメチル化を確認するため、まず、遺伝子修飾段階にて、各種重亜硫酸塩等の試薬が少なくとも用いられる。次に、メチル化シトシン含有判定段階では、メチル化シトシンをPCRにより検出する方法を用いる場合には、メチル化配列特異的プライマー、およびTaq DNAポリメラーゼ反応試薬が少なくとも用いられる。また、遺伝子の塩基配列の決定によりメチル化シトシンを検出する方法、あるいはシトシンを含む塩基配列を認識する方法では、各具体的な方法に応じて公知の試薬類を用いる。

【0146】

このように、本実施の形態にかかる検出キットでも、前記実施の形態1の検出キットと同様、前述した造血器腫瘍細胞検出方法を実施するために好ましい薬剤や標本等が含まれている。そのため、上記検出キットを用いることで、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法を容易かつ簡素に実施することができ、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となる。

【0147】

なお、本発明は、上述した各実施の形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施の形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施の形態についても、本発明の技術的範囲に含まれることはいうまでもない。

【0148】

【実施例】

以下、図48ないし図52に基づいて、本発明の具体的な実施例について説明する。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

【0149】

【実施例1】

ナチュラルキラー細胞リンパ腫を含む検体試料を用い、Townbin H. et al : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, (1979)に開示されている方法にしたがってウエスタンブロッティングを実施した。なお、SHP1抗体として#SH-P TP1 (D-11) : sc7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた (SHP1遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法)。

【0150】

10

20

30

40

50

その後、SHP1 遺伝子メチル化確認工程に移行した。まず、メチル化感受性制限酵素としてHpaIIを用いて、上記検体試料から調製した遺伝子試料を37℃4時間で処理した（遺伝子切断試行段階）。

【0151】

次に、HpaIIで処理した遺伝子試料をPCRで増幅した（遺伝子増幅試行段階）。このとき用いたプライマーペアは、配列番号7および図48（a）に示す19塩基のプライマーREP-S1と、配列番号8および図48（b）に示す20塩基のプライマーREP-AS1との組み合わせとした。このプライマーペアを用いた場合、配列番号9および図48（c）に示すように、SHP1 遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、7441塩基から7566塩基までの126塩基の塩基配列が検出される。

【0152】

なお、図48（c）におけるカッコ内の「#（番号）」は、上記SHP1 遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S1およびREP-AS1の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS1は、上記REP-AS1の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0153】

その後、アガロースゲルで電気泳動してから、得られたDNAバンドをナイロンメンブレンにブロッティングしてSHP1 遺伝子の増幅を確認した（遺伝子増幅量確認工程）。

【0154】

次に、Towbin H. et al: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76, 4350, (1979)に開示されている方法にしたがってウエスタンブロッティングを実施した。なお、SHP1 抗体として#SH-PTP1 (D-11): sc 7289 (Santa Cruz Biotechnology Inc. 製)を用いた（SHP1 遺伝子産物定量工程・蛋白質定量法）。

【0155】

上記SHP1 遺伝子メチル化確認工程とSHP1 遺伝子産物定量工程との結果から検体試料中の造血器腫瘍細胞を検出した。

【0156】

〔実施例2〕

遺伝子増幅試行段階で、プライマーペアとして、配列番号10および図49（a）に示す21塩基のプライマーREP-S2と、配列番号11および図49（b）に示す21塩基のプライマーREP-AS2との組み合わせを用いた以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検出した。

【0157】

上記プライマーペアを用いた場合、配列番号12および図49（c）に示すように、SHP1 遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、6858塩基から7084塩基までの227塩基の塩基配列を検出することができる。

【0158】

なお、図49（c）におけるカッコ内の「#（番号）」も、上記SHP1 遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーREP-S2およびREP-AS2の対応位置、並びにHpaIIの認識切断部位の位置を示している。また、プライマーREP-AS2は、上記REP-AS2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0159】

〔実施例3〕

RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1 遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。

【0160】

10

20

30

40

50

すなわち、前記検体試料から全細胞内のRNAを調製してから逆転写酵素により逆転写した。その後、SHP1特異的プライマーペアを用いてPCRにより増幅した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配列番号13および図50(a)に示す23塩基のプライマーSHP-PF1と、配列番号14および図50(b)に示す25塩基のプライマーSHP-PR1との組み合わせを用いた。

【0161】

〔実施例4〕

real time RT-PCRによるmRNA定量法を用いてSHP1遺伝子産物定量工程を実施した以外は、前記実施例3（すなわち前記実施例1）と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。上記SHP1特異的プライマーペアとしては、配列番号15および図51(a)に示す20塩基のプライマーSHP-LF1と、配列番号16および図51(b)に示す20塩基のプライマーSHP-LR1を用いた。

【0162】

〔実施例5〕

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 9821-9826, (1996) に開示されている方法にしたがってメチル化特異的PCRを用いてSHP1遺伝子メチル化確認工程を実施した以外は、前記実施例1と同様にして検体試料中の造血器腫瘍細胞の有無を検討した。なお、重亜硫酸塩としては、重亜硫酸ナトリウムを用いた。

【0163】

また、上記メチル化特異的PCRにおけるプライマーペアとしては、配列番号17および図52(a)に示す24塩基のプライマーMF2と、配列番号18および図52(b)に示す21塩基のプライマーMR2との組み合わせを用いることができる。このプライマーペアを用いた場合、配列番号19および図52(c)に示すように、SHP1遺伝子のセンス鎖の配列（配列番号1および図1～図10参照）における、7037塩基から7195塩基までの159塩基の塩基配列を検出することができる。

【0164】

なお、図52(c)におけるカッコ内の「#（番号）」は、上記SHP1遺伝子のセンス鎖における塩基の位置を示しており、下線部はプライマーMF2およびMR2の対応位置を示している。ただし、上記各プライマーはメチル化されているDNAのみを検出できるように設計されているので、その塩基配列は、上記下線部の塩基配列とは少し異なっている。また、プライマーMR2は、上記MR2の下線部の領域におけるアンチセンス鎖の配列に対してデザインされたものである。

【0165】

〔実施例6〕

検体試料として、診断用の骨髄(BM)検体と、ALL（急性リンパ芽球性白血病）患者の末梢血(PB)検体とを用いた。ALL患者から得られたBM検体は少なくとも70%の比で芽細胞を含んでいた。また、これら検体試料に対する対照試料は、化学療法によって達成された血液学的完全寛解の後に得られた。

【0166】

上記検体試料を用いてマイクロサテライト解析を行った。このときのPCR反応では、5'側のプライマーを、5'-iodoacatamide fluoresceinでラベルし、反応系は、10 pmolのそれぞれのプライマー、40 ngのゲノムDNA、1×PCRバッファー、200 μMのそれぞれのdNTPと、0.5 unitのTaq DNA polymeraseを含む20 μlの系とした。得られたPCR産物は、ABI Prism 3100 DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) にかき、Genescan Analysis software ver 3.7 (Applied Biosystems) で解析を行った。

【0167】

10

20

30

40

50

その結果、図 5 3 (a) ・ (b) に示すように、D 1 2 S 3 3 6 マーカーおよび D 1 2 S 3 5 6 マーカーによって S H P 1 遺伝子の L O H の有無を確認できることがわかった。本実施例の結果では、これらマーカーのうちテロメア側の D 1 2 S 3 5 6 マーカーでは、有意な結果が得られた 1 9 症例中 1 5 例 (7 9 %) に L O H が認められた。また、セントロメア側の D 1 2 S 3 3 6 マーカーでは、1 6 症例中 6 例 (3 8 %) に L O H が認められた。

【 0 1 6 8 】

上記何れの実施例の結果も、検体試料から十分に造血器腫瘍細胞を検出することができた。それゆえ、本発明は、複数の診断手法を併用しなくても造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができることがわかった。

10

【 0 1 6 9 】

【発明の効果】

以上のように、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法は、造血器細胞を含む検体試料に含まれる、造血器細胞に特異的な S H P 1 蛋白質およびその m R N A の少なくとも一方を定量する S H P 1 遺伝子産物定量工程と、上記検体試料から得られる、上記 S H P 1 蛋白質をコードする S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれる C p G 島のメチル化を確認する S H P 1 遺伝子メチル化確認工程と、上記検体試料に含まれる S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失 (L O H) の有無を確認する S H P 1 遺伝子 L O H 確認工程とを含む方法である。

【 0 1 7 0 】

また、本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出キットの好ましい一例としては、(1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、および (2) シトシンを含む塩基配列を認識するメチル化感受性制限酵素と、S H P 1 遺伝子の塩基配列中に含まれ、上記メチル化感受性制限酵素に認識される塩基配列を含む領域を増幅する P C R 用のプライマーと、上記 S H P 1 遺伝子のメチル化陽性及びメチル化陰性対照 D N A とのうち、少なくとも一方を含む構成か、あるいは、(1) 造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 蛋白質を抗原とする S H P 1 抗体、(2) 遺伝子処理レベルまで精製された重亜硫酸塩と、該重亜硫酸塩で処理された遺伝子試料に含まれる S H P 1 遺伝子の塩基配列中のシトシンの有無の判定用プライマー、および (3) 配列番号 3 に示す S H P 1 遺伝子 c D N A の塩基配列の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーのうち、少なくとも何れか一つを含む構成か、または、造血器細胞を含む検体試料から造血器腫瘍細胞を検出するために用いられ、造血器細胞に特異的なプロテインチロシンホスファターゼ S H P 1 遺伝子を挟み込む 2 つのマイクロサテライト・マーカーの少なくとも一方の全長またはその一部を検出する P C R 用のプライマーを含む構成を挙げることができる。

20

30

【 0 1 7 1 】

本発明の方法または構成によれば、S H P 1 遺伝子の発現を、遺伝子 D N A の修飾と m R N A と蛋白質と対立遺伝子の喪失という最大で四重のマーカーを用いて判定できることになる。すなわち、S H P 1 遺伝子の発現低下という一つの造血器腫瘍細胞特異的な現象を 4 段階で確認することができるため、非常に高い特異性で造血器腫瘍細胞を検出することができる。よって、本発明を用いることで、造血器細胞を含む微量の検体試料から造血器腫瘍細胞を容易かつ迅速に検出することができる。

40

【 0 1 7 2 】

それゆえ、本発明における悪性リンパ腫・白血病の高感度検出法を用いると、一般集団検診による造血器腫瘍の早期発見、診断および治療後のモニタリングや再発の早期発見が可能になり、これら疾患を発症した家族等血縁者における発症危険度の予測等に本発明を利用することも可能となる。その結果、本発明を臨床検査産業や医薬品産業等の産業レベルで利用することが可能となるという効果を奏する。

【 0 1 7 3 】

【配列表】

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Hematopoietic malignant cell-d
lignant cell-detection kit

<130> Y2002-P331

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2. 1

<210> 1

<211> 18404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> genomic DNA

<400> 1

ccatctagtt	gtgcccagtg	tagaccaaat	gtc
ctgcatgcgt	cctgttttggc	aaacagctgc	cca
actaccaccc	cctccagggtg	tcttaggcac	gct
actccctctt	gcagggtgtcc	ttaagttttgc	tcg
tcctgagatc	gccagcctgt	caggcaagct	gaa
gccaccccat	gggcctgctg	ctggtggcag	cgt
ttgtgccact	gccagggggag	gaaaggcctt	gat
gacttagcct	tggtgtcagt	ctcttgcgga	cct
tccctctgcc	tttccaggcc	ccatccccct	gaa
cctaaccctg	ccccagggcc	taaccctacc	tga
tgagaggctg	gagtgggtcc	ctcagcgccc	tgg
ccttctctga	ggaactgggc	tgttagggat	ttt
gagagggtttc	ccccattggt	tgctcttcct	cag
tacccaatac	cccgccgctc	tgtcagcttg	agc
ctctcccggg	ggaaggcggc	cctggaccag	cag
gctgcaggga	agctggccgc	tgtgggcggt	ctc

20

30

40

tcctggagac tattagacca gggttgtgcc ctgcagtgcc attggccctgg caggcaggat 1020

c g a g g a g g a a	g t g g c t g a t t	a c t g a g c g g t	t c t
c a g c t g t g c c	g c t g g c t c a g	c c c c g c c c c c	t g c
t a c a g a g a g a	t g c t g t c c c g	t g g g t a a g t c	c c g
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g c t t t g t t g a	t g c
c g a t c t g c c g	c t g c c c t g c g	c c t g t t t c c g	g t c
g t g a g g a c c c	c c g g c t c a c t	c a t g c t c c t c	t g c
a g t g t g t a t c	t g t t c t c t c c	a t t g c a t t t c	t a c
c t c c t g c t t a	g g a c c t g t c c	c c c t g g g t a g	c t c
g c c a c c c g c g	a a g g c c c t c c	c a c g t c c a g c	c a a
t t g g t c c c a t	c t t c t t t g t t	t c c t t t c a c t	t c c
g t a c g t g t t g	a g c a t c t a t t	a t g c a c c a g g	t g c
g a a c a a g a c a	g a c a t g g t c t	c t g c t c t c a c	g g a
c c g a a c a a a t	a a c c c a a t a a	a t t g g a t c a t	t g c
t a g a c a g c c t	t g g c c g g g t g	t a g t g g t t c a	c a c
a g g c g a g a g g	a t t g c t t g a g	c c c a g g a g t t	t g a
c t g t c t c t a c	a a a a a a t a a g	a a a t t a g c t g	g g t
c t a t g g a g a g	g c t a a g g t g a	g a g g c t t g c t	t g a
g a t g a t t g c a	c c a c t g c a c a	c c a g c c t g g g	c g a
a a a a a a a a a a	g a a a a t g a a c	c a g c t t c a t a	t g c
a t t a c t a g c t	g g a g g g a t c a	g g g a g g c c t t	c c c
g g a t g a g g a g	g a a g a g g a g c	t g g c c a t g t g	a c g
g c a g a g g a g a	t g g t g a g c a c	a a a g c c c t a a	t g t
c c c g t g g c a g	a g g a c c c t a g	t g g a g c g g a g	g c a
a g c t a g g a t g	t t g a a a g t g a	a a a c c t g a c g	a g a
c a c t t t t g g g a	g g c c g a a g g g	g g a a g a t t g c	t t g
c a a c a t a g a g	a g a c c c c a t c	t c t a t t a a a a	a a a
t g g t a g t c c t	a g c a g t t t g g	g a g g c t g a g g	t g g
g a c c a c c c t g	g g c a a c a t a g	g g a g a g a c c t	c a t

10

20

30

40

tactaataaaa tagctggatg tagtggcatg caccigtggt ctcagttact tggaaggctg 2760

aggcaggagg	atcacctgag	ccaaggagggt	cga
gcacttcagc	ctgggtgata	aagcaagatt	ctg
gaaggaaaga	aggaaggga	ggaagaaaga	aaa
cgagaaagaa	gaaagaaaaag	gaagggaaggga	aag
aagtgacacc	cagtcgaaag	aagaaaggga	aga
gaaaaaagaa	aaagtgacaa	ccggctggggc	atg
ttgggaggcc	gaggcagggtg	gatacagagg	tca
ggtgaaacc	tgtctcaact	aaagatacaa	aaa
acctgtgagt	cccagctact	agggaggctg	agg
ggaggttgca	gtgagccgag	attgctcac	tgc
ctccatctca	aaaaaaaaa	aaaaagaaaa	gaa
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gctccctagc	cct
ctgccccctgc	cccagtgcac	atcttgtcac	tgt
gtcttctggt	ccctgatccc	gtctgtggtc	att
ccccctgggtgc	agattttcatc	cttgggtttct	cag
gggtcccccac	ctctcagaac	aacttttgctc	cag
tgcccatgtg	gactctgtgc	gtgccacctc	ttt
gcacttcttc	ctccaccttc	catcatgggc	tgt
cgctgtctgc	tgcagtatgg	ttgttggggg	aaa
cgtgtttttac	ccaccttcct	actcactagc	ttg
tgagtccttag	tttctgtttc	taaaattggg	tga
gaggattaat	agtataaatgt	aaaagctggc	agc
tcacatcagt	atttgggaaa	tattgttaag	ctc
agagcagttc	cagaactttc	tacagattat	ttt
tcttcttgta	tcaccattga	tcttgatctg	tat
ggagttttcac	tctgtttgcc	aggctggagt	gcg
tccacctcct	gagaagctgg	gattacaggc	tag
agctgggtctc	gaactcctga	cctcaagtga	tcc

10

20

30

40

gattacaggt giaagtcact gcgcccagct giatititiat tttttgagac agggcttcac 4500

t c t g t c a c c c	a g g c c g g a t t	a c a g t g g c a c	a a c
c a g g c t c a a g	c g a t c c t c c c	a t c t c a g t c t	c c c
a c c a c a c c t g	g c t a a a t t t t	g t a t t t t t t g	t a g
c t g c t c t c a a	a c t t g g t g t c	a a g t a a t c c a	c c a
a c a g g c g t g a	g c c a c t g c g c	c t g g c c t t g a	t c t
a a t a t t t t t t	t c t t c t g a a t	t a t c a g g c a t	t t a
t t g t t t c c g c	c c a t a a g a a a	a t g g g g a a a a	t g a
c t a a a t g a g a	t c g t g t a t g t	g a a a g t g a t c	t g c
a g g t a g t t t t	t t a t t t t c c t	g c c a a a g g a t	a g c
g t c t c t t g g c	t t g a c a c c c t	t c a g a g g a a t	t c c
g c c t a g t t a g	t t t c t t c t g g	g t g c c g a g t t	a a t
t g g a a g g a g t	g t c t t g g g g c	c a g g g t g c a g	t g g
a c t t c g t g t g	t g g t c a g a t t	t a t g t t c c a t	g c g
g t g t a g g t g g	a c a t g g a t g a	t g a g g t g t g t	g t g
c g t a t g a c a a	g c a g g c t g t g	t g t g t a g g a c	c a g
g c t a t g g a c t	g a c g a g c t t g	t t t g t t g a a c	a c t
t c t g a a c a c t	c c g a g a t g a g	c g a g a g c g c c	a g c
c a t g t g c t c t	t c t t g c t c c t	t g g c g t t g g g	c g t
g g g g t g g t g t	c c a a g c t g a a	g g g g t a g t c a	a a g
a g a t t c c c c a	g g g c a c c a g t	g a g a g a a g a a	a a c
a a g a a a a g t g	g a a a a g c c t t	t t t t g g g g g a	a a a
a t a a t g t a g t	t a t c a t g g g a	a a a t t a g a c t	t g t
c t g a a g c a g a	a c a t g c a t a a	t g t t c a t a a a	t a t
t t t t t t t t t t	g a a a t a g a g t	c t t a c t g t g t	t g c
g g c t c g c t g c	a a c c t c g g c t	t c c t g g g t t c	a a g
a g c t g g g a t t	a c a g g c g c c c	a c c a c c a t g c	c c a
a g g g g g t t t c	a c c a t g t t g g	c c a g g a t g g t	c t c
c t t g g c c t c c	c a a a g t g c t g	g g a t t a c a g g	c g t

10

20

30

40

tttatacaca cccaigcaaa cagcatccag atagagacaa agagccticc cigtacccta 6240

a a a g t t t c c c	a g a a a t t g t t	c c c a g t t a g c	a t a
c a t c a t a t a a	c a t t c a a a a a	g g t a t g t a g a	g a a
c a g c c a c c c a	g t t t c c c t c c	c t a g g g g a a g	c c a
g t t g a g c t g c	t t t t c c t c g t	t t t g g t t t g g	c g g
g t a g g c a g c a	t c a t a t a c c t	t a g t g t t t a g	g g c
t c a g c c a t g g	t g a g g a c c t t	g t c c c c c a g c	c c c
c t g g g g c a g g	g c a g a g g c c t	a g g g a c a a g a	a t t
t c a g g g t c a t	g t t g t c c a t c	c c t c t g c c a c	a g t
a g a g g a g g g c	a c c c t t c t c t	c t t g c a a g c a	t t g
t c c c a t g g c a	g c c c c t t t g g	a c a a g g a g g c	t c t
g c t g g t g t a t	a g g a g t t c a a	a g c a c t g g c t	t t g
g g c a c t g c a g	c t g a c t c a c t	g a t g g a c t c a	g g c
t t c c t t g t c t	g t a a a a t g a t	a a a g a t a g c c	c c t
a t c a g a c a a g	g c a t g t g a a c	g c c a t t a t a g	c a c
c g a t g a c a g t	t g t c a c c g c c	a t c a t t g t t a	t t a
g c a g c t g g t g	g a g g a g g g a g	a g a t g c c g t g	g g a
t a t c t g g g c c	t g g a g t g t g c	a a g g c a c a c a	t g t
g t g c a a t g c c	a t g c t c c t g a	g c c t t t g a t t	g c a
a c c c c c a g t g	c c a c c c t g c t	c t g c t t c t c t	t c c
a a g t g a g t t c	c c c c a a g g g g	t c g g c c g c g c	c t c
c a g g c c a g t g	g a g t g g c a g c	c c c a g a a c t g	g g a
a c t g g g a g c t	g c a t c t g a g g	c t t a g t c c c t	g a g
c t c c t c a t t c	c c t g c g c c c c	c t t c c t c t c c	g g a
t g c c a c c c a c	g g t a g a c a g g	a g g c a a g g g t	g c c
c c c t g c c t g g	g c c g c c c a g g	t g g t t t c a c c	g a g
t g c t c a a g g g	c c g a g g t g t c	c a c g g t a g c t	t c c
g t g a c t t c t c	g c t c t c c g t c	a g g t a g g t g g	g c c
t c t c t t g t g c	c a t c c a g g c c	c t g a a c c a c t	c a t

10

20

30

40

```

ccccgicigt tcccttgccc ccaacccccca cactccccat cccigicigt gccacccat 7980
gccccatgtgt gccccccaccc aggacctcag ccg
caccgactgg cctcaccgcc tgggtgccctg cag
gatccagaac tcagggggatt tctatgacct gta
agagctgggtg gagtactaca ctcagcagca ggg
catccacctc aagtaccgcg tgaactgctc cga
caccccccgcc attcccaagc agggatgagc cgg
gggagactgg cagccggcgc tgcctacctt cca
gctctcaatg tccctcctcc ctgctgtcct ggg
accttttcca cctaaccctg aggaagccac aga
ctggcccgctg caaccacaggt cccactggag aca
tcgtgcaggc cagctctgtt gttagaaagc tct
ctccgtctgc cctcaccctc agcacatgtt agg
gatgggggatg aatgcttgcc aagacacttg atg
ggctctgtcct gtgggggtcaa ataggctctcc ggc
gtgaagtgtt caccctgtgta aagtgtctca cgc
gcatttctctt cctgtggcct ccccgactcc tcc
ggctggggggc tctgaatgct cctcatgaca cca
tgccagatcc ccttagagta aaggggcagcg gaa
cctggggccaa gccgacttgc ccttgccgtg gat
atgatcggga accttgctcc tgccagcttg cag
gcataaatat ttttgggtcaa ggcactgatt gaa
agccctgttg cccacctggg aggcctcctt tcc
tctctctgtg agcctcacat ggctggctcc gtg
ccgcaaacact caggggggctt ttgggcaccga gac
ccttgccctcc agccaggaga ggaggacggg ctg
gcaggggcccc aggaggcccc tgcagaggag gct
agagagagaaa ggaaggaggagg gcagtgccgg ggc
tgaggaggccct tttggggtgac ccgtcccagg agc

```

10

20

30

40

gigagaggct ctcttccca ggtctgctg igtctctgc ctgtctgtg cgcttctcc 9720

t c t g c g a g a a	t t t g c a t c t g	t c c c t c g g t g	g c t
t t g c a t g g a g	a c t t c c t c a t	c c t g g g g c c t	g a g
c c t g g g g t c c	t a g c c t g t c c	c c a g g c g g t g	g g c
t c t g g g g g t c	t c t c g g c t g g	a g t c a c c t c c	g g g
g g t c c t c c c c	t c c t t c c c c c	c a t c c c t g c g	g t t
c c t g g g c t g a	g g a a a c c t c a	c a a c c t c a c t	t c t
t t t t t t c c a t	c a c g t g g t t t	c c t g t g g g g c	t g g
g g a a a g g g g t	g t g c t t c g g g	g a a a g g g c t t	a g t
a a a t c c g t t t	g a a c c c t g g g	c t c c c c t t c a	g t g
c t a c a c c a c t	c t t t c c c c a g	t g g g g t t g t c	t t c
t c c g c c t t c c	t t g t g a c t t g	a g t c t g t g t g	t c c
c t c g g t c t g c	g t t t c t c t t t	g c c t c t g g t c	t c t
a g a t t c a t c c	t t a g c t t c t c	t c c t c c a a a t	a t t
c a g a g g t g g g	c t c t g g g t t c	g a a g c c c g g t	t a g
c t g g g a g g t c	g a g g c t g c a g	a g a g c t g t a a	c c g
g a g c t c t g g a	a g c t t g c c c t	a g a g t c a g t c	a a g
g c g t c a g t t t	c c t c a t c t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a c c t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g c t t g a	t t t c c g g c c c	c t c t c t g t g a	a t g
c t g g g t c t t a	c c t t c c c t g a	c g c t g c c t t c	t c t
g g g c a g g c a g	a g a c g c t g c t	g c a g g c c a a g	g g c
a g c c t c a g c c	a g c c t g g a g a	c t t c g t g c t t	t c t
c c a g g c t c c c	c g c t c a g g g t	c a c c c a c a t c	a a g
g g c g g g g g a g	c c t c t g c t g a	g g c t c c t g t c	t g t
c t g c c t g g g c	t t g a a t t c a a	g g c t g g g g a c	c c a
g c c t a a t t t g	g c t c c c c c c a	g g g t g g a c g c	t a c
a g c c t c a c g g	a c c t g g t g g a	g c a t t t c a a g	a a g
t t t g t c t a c c	t g c g g c a g g t	c a g g g g t g g g	c c c

10

20

30

40

```

tccccagat gigagcttct gggatctctg agttgctgac ttctcgtctt tccccacccc 11460
agccgtaacta tgccacgagg gtgaatgcgg ctg
acaagaagca ggagtccgag gatacagcca agg
atggtgggga ccgggcagggc tgggggcagct gag
cggacacctt cccctccttg cccacctctg ctc
atggatgccc tcttttgggag ctgatgctca ttt
agcaggagggt gaagaacttg caccagcgtc tgg
agaaccgcta caagaacatt ctccccctgtg agc
accgccccctg ccccagctgc ctccccctcat ctc
ggggccatctc cccacaccccc ccacagagcc tcc
ccagaagtgc ctccccacca ccagcaggca ggt
actccctcac tccctccata cagatgatcc ccc
gcctcatggc ttctgagacc agaattggcct gtt
gtgagtcacct ggctaaccaca gaccatctctg cct
agccgagtgat tcctgcaggga acggggacagt aac
aactacatca aggtcagcag tgtggggccac gtg
cctgtcttgggt gggggggaccc tagatccaga gac
tgcatggggtg aggggtggcag tgggttcaggga cct
gggggtgcgtc tctccacgct tgcgtccaga acc
agacctacat cgccagccag ggttgtcttg agg
cgtggcagga gaacagccgt gtcatcgtca tga
tagggcgccc ccccttcccc gcatccgccc ccg
gagcagtcag atgccaggggc agaaagggat ctc
aaactgaggga ctagtgacaa agtctcgact aca
atccctgggc tcttctgagc tccagaccca ggt
ctgccccacc tgtctgcatc caggccccctc ctg
agtctgcccc ttaccctgca ggctccccctt aca
gatcccatcc gtgacacaaa ctggggtcaag ttc
tcctgggtcac ctttgggata aagtcgcact cta

```

10

20

30

40


```

tccctctgac ccgcacgctt ctctgaagg ctaccgccc ccagcagccc cagctcttc 13200
a g g t t c c c a g   c c t t t c t t t g   c a c a a g c t c a   t t t
t a t c t c t g c c   t g g c a g a t g c   c t c g t t t t t g   a a g
g a a t c c a g g t   c t t g t t t c c t   c c a g g a c c t a   g a g
t c c t c a g c g c   g g t g t c t c c c   c c g g t c a c c t   g t c
a c a g a c t g g g   t g t t a t t t g t   g t c t g t g a a g   c t g
g c c t g c c c t g   g c a a c g t t t g   t t g a a t g a c a   a a c
g c c t c a c c a c   c t g t t g g t g g   t t g a t c t g a g   a c g
a g c c c a t c c g   t c c a t c c a a c   a a a t g t t t g g   g c c
g g a c c t g g g a   t g g g c c a c a g   t g c c c t g c t c   t g t
c c a g a a c a a a   t g c g t c c c a t   a c t g g c c c g a   g g t
c t c t g t g a c c   a a c t g c g g g g   a g c a t g a c a c   a a c
c t c c c c g c t g   g a c a a t g t g a   g t g g c c c c c a   c g c
g g a c t t g t t c   t c c t c t c t g g   t c g g g t a g g g   t g a
g g g g c a c t g a   c c c t a t g t c c   t c g g c t t a g g   g a g
a g t a c c t g a g   c t g g c c c g a c   c a t g g g g t c c   c c a
t g g a c c a g a t   c a a c c a g c g g   c a g g a a a g t c   t g c
g c a g g t g a g g   a t g a t a a t c c   t g a t g g t a g t   a g t
t g c c a t g a g c   t g t t a t a a g c   a a t a t a a a c g   t t a
c c c c c g g c t t   c t c c t g g g t c   c c c t c a t g g c   t c c
c c a g c c c c a c   t t t g g c c c t c   t g c c t g t g g g   t a t
c a t c t c g c c c   a a c c c t g c c a   a a t a c a g a g g   a g g
c c a a g c t a g t   c a g g g c a a g g   c c g g g c a g g c   a c c
c g c t t t c t c t   c g a g g t c c c a   t t c t g t t g g t   t t c
t g c t c c c c a t   t c c t c c t c t t   t t t c c a t c g g   t a g
c t g c c c t c t c   t c c c a g c t t c   c c c a g g c a g t   g c c
g a t g g g t g a t   g c t t c t t t g g   g g c t g c a c a t   a a c
t g a t c a g g a g   a c c t c t g g t a   a g g t g c a g a g   g t g
a c a g g t g a g c   c c a c t g a g c t   g g c c t g g c c t   g g g

```

10

20

30

40

```

ccctcgcctta ccagctgigt ggctctggac aaattactta acttttctaa ccttcagctt 14940
cctcatctgt aaaaatcagga tctcaggggt gtc
gtggctggaa ttccgtcagc cctcaaaaac tgg
tcagggcagag aataggggaa tgggaacctg cct
tggaccccag gcctgcgacg gcctctggct tcc
tgggacaggg caagtcggct gaatctagag gtg
ctctgtcctg tgctctctca gggacaggcc cat
gccacacaca cattcacaca cttcttgaaa gcc
aagggaagtgg gtgtgggggg ttatttttga caa
tcaggggcata agcttgctgg gctcagctga ggg
ttgcccagggt ctggggaagg agagaaactt cct
ccctgtgccc ccgcacccctg ctgtctcagg gct
ggaaaaggga agtgaagcca tgctgagaga cgc
gaggggctcag ggtacctggg agccggcagg aca
tccgggggtgg gggcagccac tcaactaggag tga
aaggatggtg gcagctgggg agccagcgtc agc
catgcagagc tggggcaaacc tccatcatca ctt
ccatcaactgg aggctcaggc tgctcctgtg gtg
cccccccttcc cgggggagggc ttgactggcc tct
cggcatcggc cgcacaggca ccatcattgt cat
caagggtgag gggcacctgg gggtttgggg gtg
ctatgcctgg acctgagggt tgactgcccc cca
ccagaagacc atccagatgg tgcggggcgca gcg
gtacaagttc atctacgtgg ccatcgccca gtt
ggtcctgcag gtgcgtgcag agcaggggcct ggg
gtgccacctg gccctgctgg gaccaccacc ttc
aaggggccagg agtcggagta cgggaacatc acc
gccaaaggcct ccgcacctc gtccaagtga gtg
cccctttgtc ctgcccagcc cgatcctcac ttt

```

10

20

30

40

```

gggacctggc ttcaagtica ggcttgggtc tcaccccttc tgttcataag catttctga 16680
gtgccccacac gtgtggggcct ctgctaggta cca
ctctgttcctc taggagcttg gagtctagtg cag
ggggtggcca gagggggactg ccagtgccgg gtc
aactgccttgt acttgcccc cctgcaccgg ctg
cctgcacact aagaacaaga gggaggagaa agt
gaagagcaag ggttccctca agagggaagtg agc
agctctttctg cctggggtgtc ctccctgccc tgc
ctggggtggat ggggtggccg cagcctcatt ctg
gttccacctc caggttccag ctacctctc act
agccctgacc ctgtggaagc atttcgcgat gga
ccccattctt ttgtaattta aatggctgca tcc
agcccagcca ggccccaggc agggccaacc ctt
caactgtgtgt cgccctctgag cccttttgctt gcc
caggatgggt aactgtgtgt gcctccgtgc gtg
agacggacgt gggtcgggac tccgccctcgc acg
ccagtctcct tcttttaaaat ggaggggcgat cat
atgacggctg acgataagac gggcacagtg act
actaaaagac tacacacggt agttcagtc t agg
gcggaaactg agggacagaa aaactaagta act
atggaacagt gaggctggga ttcgaacca ggc
accctggagt tgcagctggg gccaccctca ggg
gagttccaga tctgaactaa gaagagtagt taa
cccggctgcg tccccctctgg cgggaacagg gac
cagctcctcc cctcatccag gccgctgctg ccc
ctggctgacg tgaagagtg c tttgtttttt gtc
ggggttttctt ctttattttga aacactgggtg tcc
cctcaggaag tgctggcgcc cactcctgga aag
agaggctggg cgtgcattac tcagcaaadc ctt

```

10

20

30

40

acagtcctccc gacctcctgg aacttaggag gcctggcagg gaga

18404

<210> 2

<211> 18404

<212> DNA

<213> Homo sapiens

10

<220>

<223> genomic DNA

<400> 2

tctccctgac	cagcctccta	agttccagga	ggt
gggggctctg	taaggatttg	ctgagtaatg	cac
gctgtctcag	ccttttccagg	agtgggcgcc	agc
tttactcccc	aggacaccag	tgttttcaaat	aaa
aaggaagagg	ggacaaaaaaaa	caaagcactc	ttc
caagaggata	agggcagcag	cggcctggat	gag
ctgaggagcc	tgctccctgtt	cccgccagag	ggg
gcttccggct	gttaactact	cttcttagtt	cag
gatacagggcc	ccccctgaggg	tggccccagc	tgc
gggggtcagac	agcctggggtt	cgaatcccag	cct
gcaagtgacc	aagttactta	gttttttctgt	ccc
tgacagaagt	gcctagactg	aactaacgtg	tgt
agcgtgtgat	gagtcactgt	gcccgtctta	tcg
accaccctgt	tatgatcgcc	ctccatttta	aag
tcaccctccc	acgtgcgagg	cggagtcccg	acc
ttcacgcgag	gcacgcacgg	aggcacacac	agt
cccactcact	gggcaagcaa	agggcctcaga	ggc

20

30

40

tacaagagga gaagggctgg cccigccctgg ggccctggctg ggctatatac agggicaggg 1080

agaggtgggg	gggatgcagc	catttaaatt	aca
ttgtgagtc	gtccatcgcg	aaatgcttcc	aca
gggagtgagg	gagtgagagg	gtagctggaa	cct
gctgggaagc	acagaatgag	gctgcggcca	ccc
aaggacacag	ggcaggggcag	ggaggacacc	cag
aggacagcac	cgctcacttc	ctcttgaggg	aac
gctgcttctt	cactttctcc	teccctcttgt	tct
ccttggtgtct	gcagccgggt	gcagggggggc	aag
cagcacaggg	ggacccggca	ctggcagtc	cct
agccacggtc	cctgcactag	actccaagct	cct
gagtgcgctg	ctgggtacct	gcagaggccc	aca
aacagaaggg	gtgagaacca	agcctgaact	tga
gtcctctcca	gaaagtgagg	atcgggctgg	gca
gcagtcaggg	ccactcactt	ggacgagggtg	cgg
gctgggggat	aggtgatgtt	cccgtactcc	gac
agggacagtg	ggaagggtggt	ggtcccagca	ggg
cccccccccc	ccccaggccc	tgctctgcac	gca
tggtttcaat	gaactgggcg	atggccacgt	aga
ccatgcccga	gcgctgcgcc	cgcaccatct	gga
ccaggccctgg	gtgggggggca	gtcaaacctc	agg
tgctcacccc	ccaccccccaa	acccccagggt	gcc
tgagcatgtc	gatgacaatg	atgggtgcctg	tgc
gggggtgccat	cagaggccag	tcaagccctc	ccc
ccagccccag	gcaccacagg	agcagccctga	gcc
ggtcaccggg	caagtgatga	tggagggtttg	ccc
ggctctgcgg	tgctgacgct	ggctccccag	ctg
gcgcccgaactc	ctcactccta	gtgagtggt	gcc
aatcccacca	ctgtcctgcc	ggctcccagg	tac

10

20

30

40

ggagttaagg agcgctctc agcatggctt cacttccctt ttcttcaaa cctgacgic 2820

agggaaggga	tagccctgag	acagcagggt	gcg
agcagtgag	taggaagttt	ctctcctttc	cca
ccccaggccc	accctcagct	gagcccagca	agc
tcaaacccag	attgtcaaaa	ataaccccc	aca
aaaggccatg	gggcctttcaa	gaagtgtgtg	aat
agctctcggg	gatgggcctg	tccctgagag	agc
cccatcgggg	gcacctctag	attcagccga	ctt
gggggaagg	aggaagccag	aggccgtcgc	agg
ggaccggggc	aaggcagggtt	cccatctccc	tat
agtaacagcg	cccagttttt	gagggcctgac	gga
tgagttctca	cgacaaccct	gagatcctga	ttt
aagttaagta	atttgtccaa	gaccacacag	ctg
cctctcatcc	accagggcca	ggccagctca	gtg
cttgcagccc	ccacctctgc	accttaccag	agg
tagacagagg	agttatgtgc	agccccaag	aag
ggccaggatg	gggcactgcc	tgggggaagct	ggg
aagccctgcg	gctaccgatg	gaaaaagagg	agg
tcctggggaga	agaaaccaac	agaatgggac	ctc
ggcctactgt	gggtgcctgc	ccggccttgc	cct
ggtcccgggc	tcctcctctg	tatttggcag	ggt
ctctgaggaa	gatacccaca	ggcagagggc	caa
cccagggttc	tggagccatg	aggggaccca	gga
aatgtgcgag	ctaacgttta	tattgcttat	aac
tctcagctgt	cactactacc	atcaggatta	tca
ccctgcgtga	ggcagacttt	cctgccgctg	gtt
cccaggctca	ctgggggaccc	catggtcggg	cca
ccgaatcagg	tctccctaag	ccgaggacat	agg
cctcatccat	ctcaccctac	ccgaccagag	agg

10

20

30

40

aatggggcag ggcgiggggg ccactcacat tgtccagcgg ggagaccigt aaggtaaggga 4560

g t t t g t a t t c	g g t t g t g t c a	t g c t c c c c g c	a g t
g c t g c a t g c c	c a c c t c g g g c	c a g t a t g g g a	c g c
g g g g a t g a g g	c a c a g a g c a g	g g c a c t g t g g	c c c
t g c c t g g c a c	c g g c c c a a a c	a t t t g t t g g a	t g g
a c c t g g g c t c	t c g t c t c a g a	t c a a c c a c c a	a c a
c c g g t a c a t c	c g t t t g t c a t	t c a a c a a a c g	t t g
t g c a a a c c a c	a c a g c t t c a c	a g a c a c a a a t	a a c
g a g c t c a c a g	a g a c a g g t g a	c c g g g g g a g a	c a c
c g t a a t t c t c	c c t c t a g g t c	c t g g a g g a a a	c a a
t c c g g c t g t g	t c t t c a a a a a	c g a g g c a t c t	g c c
t t c c t a g c a g	a a a a t g a g c t	t g t g c a a a g a	a a g
c t g g g g g c g g	t g a g c c t t c a	a g a g a a g c g t	g c g
a t g c c a g g c c	t t a g a g t g c g	a c t t t a t c c c	a a a
c a g a a a g g a a	g g a a c t t g a c	c c a g t t t g t g	t c a
a g a g g g t g c t	g t g t a g g g g g	a g c c t g c a g g	g t a
g g c a g g g a g g	a c a g g a g g g g	c c t g g a t g c a	g a c
g a c a g c c t g g	a a c c t g g g t c	t g g a g c t c a g	a a g
g g g t c a c g t t	g t g t a g t c g a	g a c t t t g t c a	c t a
c c c t c a c c c c	t g a g a t c c c t	t t c t g c c c t g	g c a
g a c c a c a a g c	a c g g g g g c g g	a t g c g g g g a a	g g g
c t c t c g g g t g	g t c a t g a c g a	t g a c a c g g c t	g t t
a t t g a c c g t g	g c c t c c a g a c	a a c c c t g g c t	g g c
g c c t a g c a g c	t g g t t c t g g a	c g c a a g c g t g	g a g
t g g c c c a g c a	c a g g c c c t g a	a c c a c t g c c a	c c c
t t t g c c c a g c	t g t c t c t g g a	t c t a g g g t c c	c c c
g c c t c t c c t c	c c a c g t g g c c	c a c a c t g c t g	a c c
g a c c c g g g g a	t g t t a c t g t c	c c g t c c c t g c	a g g
g g g c g g a g a g	g a g g c g a g a t	g g t c t g g g t t	a g c

10

20

30

40

```

cctcctgagc taacaggcca ttctggcttc agaagccaig aggcitgcgg gggactiggg 6300
gcagcagggg tgggggga tca tctgtatgga ggg
agcaggggggc aacctgccc tgc ctgggtgggtgg gga
ttggagaagg gggaggc tct gtgggggggtg tgg
tgagagacctg tgagatgagg ggaggcagct ggg
gcagccctggg tgctcacagg ggagaaatgtt ctt
ccgctgccc t tccagacgct ggtgcaagtt ctt
tgtgggtggg gaaatgagca tcagctccca aag
gggtgggtca ggagcagagg tgggcaaggga ggg
gctgcccacca cctcagctgc cccagcccctg ccg
ccagaaggcca gcccttggctg tatcctcggga ctc
gttctcaatg tcagcccgcat tcaccctcgt ggc
agaagtcagc aactcagaga tcccagaagc tca
gggaggcagc tggggcccacc cctgacctgc cgc
tcaatcccccg tcttcttgaa atgctccacc agg
ccacccactg t gtagcgtcc accctgggggg gag
gtctccctcc ctgggtcccc agccttgaat tca
acactgtggt cacagacagg agcctcagca gag
tcgcacatga ccttgatgtg ggtgacctg agc
tcactgagca cagaaagcac gaagtctcca ggc
gtccaggggct cgcccttggc ctgcagcagc gtc
tggtaccacc tagagaaggc agcgtcaggga aag
ctgagcagag acattcacag agaggggccg gaa
tgcgctacat gcttccaaat ccaccacctc att
taggtatgat attaccccca ttttatagat gag
ggcctaggggc ccttgactga ctctaggggca agc
gtgcagtggc gcggttacag ctctctgcag cct
cctccagagt tctaaccggg cttcgaacc aga
gcaatat tca aaatat t tgg aggagagaag cta

```

10

20

30

40

tgigccccag cagagaccag aggcaaagag aaacgcagac cgaggccaca ccacagggag 8040

t g g t g g g a g a	t g g a c a c a c a	g a c t c a a g t c	a c a
a g g g a g g c g g	g g a a g a c a a c	c c c a c t g g g g	a a a
c t g g a t g a t g	t c a c t g a a g g	g g a g c c c a g g	g t t
c a g a a a g c a g	a a c t a a g c c c	t t t c c c c g a a	g c a
c c c c a c a a a g	c c c a g c c c c a	c a g g a a a c c a	c g t
g g g a g a g a g t	g a g a a g t g a g	g t t g t g a g g t	t t c
g c a a a t t t t c	c a a c c g c a g g	g a t g g g g g g a	a g g
t c t c a c c c c t	g c c c g g a g g t	g a c t c c a g c c	g a g
g g g c t a c t t c	a g c c c a c c g c	c t g g g g a c a g	g c t
g a g c c c c t t c	c c t c a g g c c c	c a g g a t g a g g	a a g
a g g a a g c g c a	g a g c c a c c g a	g g g a c a g a t g	c a a
c a a g g c a g a g	g a c a c a g c a g	a a c c t g g g a g	a a a
g g g t g a c a c t	g g c t c c t g g g	a c g g g t c a c c	c a a
c t t a a c c t c c	c g c c c c g g c a	c t g c c c t c c c	t t c
a c c c a g g c c t	c a g c c t c c t c	t g c a g g g g c c	t c c
c a g g c a c t g g	t c a g c c c g t c	c t c c t c t c c t	g g c
a g c t t t a g a g	g g t c t c g g t g	c c a a a a g c c c	c c t
c a g g g g g c a g	a c a c g g a g c c	a g c c a t g t g a	g g c
a g g c c g a t c c	a g g a a a g g a g	g c c t c c c a g g	t g g
c a g c t c t a a g	t t t c a a t c a g	t g c c t t g a c c	a a a
t c t c a g a g a g	g c t g c a a g c t	g g c a g g a g c a	a g g
t g a a t g c a g g	g a t c c a c g g c	a a g g g c a a g t	c g g
c c c t a g c g t t	a t t c c g c t g c	c c t t t a c t c t	a a g
g a a a g g a g c c	a t g g t g t c a t	g a g g a g c a t t	c a g
g g g a g a c c a c	a g g a g g a g t c	g g g g a g g c c a	c a g
t g c c c g g g a c	a g c g t g a g a c	a c t t t a c a c a	g g t
t c t c t g t t t g	g g c c g g a g a c	c t a t t t g a c c	c c a
c t g g g a c a a g	g c a t c a a g t g	t c t t g g c a a g	c a t

10

20

30

40

cicctcactg tcciaacaig tgciggggig aggggcagac ggaggaaggc aggcicgatt 9780

c c a g a g g a a g	a a g a g c t t t c	t a a c a a c a g a	g c t
a g t g g c c t c c	c t g t c t c c a g	t g g g a c c t g g	g t t
c g a g g c a g c t	t t c t g t g g c t	t c c t c g g g g t	t a g
a g a c a c c a g g	t c c c a g g a c a	g c a g g g a g g a	g g g
a g g g g a g g g g	a t g g a g g g t a	g g c a g c g c c g	g c t
c a g g g t g g g a	g c c g g c t c a t	c c c t g c t t g g	g a a
c a c t a g t g g g	a t c g g a g c a g	t t c a g c g g g t	a c t
c c t g c a g g a c	a c c c t g c t g c	t g a g t g t a g t	a c t
t c t c c c c t c c	a t a c a g g t c a	t a g a a a t c c c	c t g
g a t c c c c c a c	c c t g c a g g g c	a c c a g g c g g t	g a g
a g g g c a g g g a	t c g g c t g a g g	t c c t g g g t g g	g g g
a g g g a t g g g g	a g t g t g g g g g	t t g g g g g c a a	g g g
g g g a a c c a g g	a a t g a g t g g t	t c a g g g c c t g	g a t
g g g t t g c g g g	g g g c c c a c c t	a c c t g a c g g a	g a g
g g g c c g a g c c	a g g a a g c t a c	c g t g g a c a c c	t c g
c c c a c t g a g g	t c t c g g t g a a	a c c a c c t g g g	c g g
c g t g g g c a c c	a g g c a c c c t t	g c c t c c t g t c	t a c
t c c t g g g g g c	t t c c g g a g a g	g a a g g g g g c g	c a g
c a g g c a g a g a	g c t c a g g g a c	t a a g c c t c a g	a t g
a c c c c c g g t g	g t c c c a g t t c	t g g g g c t g c c	a c t
g g g g a c a g g a	a g a g g c g c g g	c c g a c c c c t t	g g g
a g c a c a g c a a	g g g a a g a g a a	g c a g a g c a g g	g t g
t c c c a c a c g t	c t g c a a t c a a	a g g c t c a g g a	g c a
g c a g t a a g g a	c a c a t g t g t g	c c t t g c a c a c	t c c
a a c c c a g a c g	g t c c c a c g g c	a t c t c t c c c t	c c t
c t g g c c c a c g	c t a a t a a c a a	t g a t g g c g g t	g a c
t g c c g g g c g c	t g t g c t a t a a	t g g c g t t c a c	a t g
c c c t a t g a a a	c a g g g g c t a t	c t t t a t c a t t	t t a

10

20

30

40

```

ttaaaggcat igcctgagtc catcagtgag tcagctgcag igccaggatt caaaccaga 11520
cagtc ccggtt ccaaagccag tgc tttgaac tcc
aacagagatt aagagcctcc ttgtccaaag ggg
taagaccttg ccaatgcttg caagagagaa ggg
ttgtccatgc cactgtggca gagggatgga caa
gggtccctttc taatttcttgt ccctaggcct ctg
cctatctcct ggggggctggg ggacaagggtc ctc
tgatcttaga ggccctaaac actaagggtat atg
aaacatcaac accgccaaac caaaacgagg aaa
acacatatatg gtggctttccc ctagggagggg aaa
gagacacttg gttctctaca taccttttttg aat
ataaaaaataa atatgctaac tgggaacaat ttc
ctcttttgtct ctatctggat gctgttttgca tgg
cgcagtggtc cacgcctgta atcccagcac ttt
gtcaggagat cgagaccatc ctggccaaca tgg
aaaaaaaaattag ctggggcatgg tgggtgggcgc ctg
caggagaatc acttgaaccc aggaaggccga ggt
actccagcct ggcaacacag taagactcta ttt
ttgtgtgctt aataatttatg aacattatgc atg
ttttaagccc aacaagtcta attttcccat gat
aaacatcaat gtttttccccc aaaaaaggct ttt
at ttgttttct ggtttttcttc tctcactggt gcc
gcatgggtcca gcttttgacta ccccttcagc ttg
gcgggaacccc cacgcccacac gccaaaggagc aag
gcggggacacc cgctgggcgct ctcgctcatc tcg
ggcactgagc aagtgtttcaa caaacaagct cgt
agtacagctt cctgggtccta cacacacagc ctg
cacagtcaca gcacacacac ctcatcatcc atg
gcacatcccc acgcatggaa cataaatctg acc

```

10

20

30

40

```

gcaccaaacg cccactgcac cctggcccca agacactcct tccagggcct aaacccacit 13260
ggtgggaagg aattaactcg gcacccagaa gaa
tggaagaggc aggaattcct ctgaagggtg tca
gtacagcttc tgctatcctt tggcaggaaa ata
gtgtgggggtt tgcagatcac tttcacatac acg
tgatgtagga atcatttttcc ccatTTTTctt atg
aattacaaga gtaaattgcct gataattcag aag
gataaaaagta gagatcaagg ccaggcgagcagg tgg
ggggggtgagg ctgggtggatt acttgacacc aag
aaacccctgtc tctacaaaaa atacaaaatt tag
cccagggtact tgggagactg agatgggagg atc
agtgagccat ggttgtgcca ctgtaatccg gcc
aaaaataaaa atacagctgg gcgcagtgac tta
ccgagggtggg aggatcactt gaggtcaggga gtt
ccccatctct actagcctgt aatcccagct tct
gatcatgcca ccgcactcca gcctggggcaa cag
aattaaaaaac catacagatc aagatcaatg gtg
gcaaacaggc caaaataatc tgtagaaagt tct
gcctgacaaa tgagcttaac aatatTTTccc aaa
agggttttcag tgctgccagc tttttacatta tac
gtaggtgtta ttcacccaat ttttagaaaca gaa
gccaagggtc acaagctagt gagtaggaag gtg
gcctgggtgcc ctttccccca acaaccatac tgc
tggggcactgc cacagcccat gatggaagggt gga
tgggtcaggg caaagagggtg gcacgcacag agt
aagccatgtg gctggagcaa agttgttctg aga
tcaaggccag gctgagaaac caaggatgaa atc
cctgggcaggaa aaatgaccac agacgggatac agg
cgggtgggggcc gacagtgaca agatgtgcac tgg

```

10

20

30

40

caagaatcag cagggctagg gagccacca cccacaaact cgccagtact ctgtaagcag 15000
 gttgtcacttt tttctttttct tttttttttttt ttt
 caggctggag tgcagtgacg caatctcggc tca
 caattctcct gcctcagcct ccctagtagc tgg
 gcctaatttt tttttttgtat ctttagttga gac
 tcttgaactc ctgacctcgt gatccacctg cct
 gcttgagcca ccatgcccag ccggttggtca ctt
 cttttttcttt ttcttttcctt tcttcttttcg act
 ttctttttctt tcttttccttc cttcctttttc ttt
 cttcttttctc ttttttctttc ttcccttccct tcc
 ttttttttgac acagaatctt gcttttatcac cca
 tcactgcagc gtcgacctcc ttggctcagg tga
 tgagaccaca ggtgcatgcc actacatcca gct
 tcgtagtaga gatgagggtct ctccctatgt tgc
 aagtgatcct cccacctcag cctcccaaac tgc
 taccagtat ttttttttttaa tagagatggg gtc
 actcctgagc tcaagcaatc ttcccccttc ggc
 gcgccacctc atctcgtcag gttttcactt tca
 tgctgtggcc ctgcctccgc tccactaggg tcc
 tgttttgttcc cacattaggg ctttgtgctc acc
 cttgatcact acgtcacatg gccagctcct ctt
 gtcacctcct cgggaaggcc tccctgatcc ctc
 gtcacttgct agcatatgaa gctgggttcat ttt
 gtctcactct gtgcgccagg ctgggtgtgca gtg
 acctcccagg ctcaagcaag cctctcacct tag
 tgtgccacca caccagcta atttcttatt ttt
 ccaggctggt ctcaaactcc tgggctcaag caa
 tgggatcaca ggtgtgaacc actacaccg gcc
 tctgagaatc tgcaatgatc caattttattg ggt

10

20

30

40

ggaatgtaag ciccgtgaga gcagagacca tgcicgtctt gttcactcca gtattaccag 16740

c a t c t t a a a c	a g c a c c t g g t	g c a t a a t a g a	t g c
g c a g g g g a a a	g g g a a g t g a a	a g g a a a c a a a	g a a
g t g c g g a g a a	g t t g g c t g g a	c g t g g g a g g g	c c t
t g a g g t g t t g	t g a g c t a c c c	a g g g g g a c a g	g t c
a g a g g c t g g a	a g t a g a a a t g	c a a t g g a g a g	a a c
t t a a a g a g g g	g g c a g a g g a g	c a t g a g t g a g	c c g
a a g t t c a t a g	g g a c c g g a a a	c a g g c g c a g g	g c a
c g t c g g a g t g	a g c a t c a a c a	a a g c c c t c c c	t c c
c c g a t g g t g c	c c g g g a c t t a	c c c a c g g g a c	a g c
g g c g g a g g g c	c g c a g g g g g c	g g g g c t g a g c	c a g
c c a g g t g a g g	a a g a a c c g c t	c a g t a a t c a g	c c a
c a a t g g c a c t	g c a g g g a c a a	a c c c t g g a c t	a a t
g g g g c t g g c c	c g a g a c c g c c	c a c a g c g g c c	a g c
a g c a g g c c c g	c c t g c t g g t c	c a g g g c c g c c	t t c
c t c c a c c t g g	a g c t c a a g c t	g a c a g a g c g g	c g g
a g t a a c c c t g	g c t g a g g a a g	a g c a a c c a a t	g g g
a g g g c c t a a g	g a a a a t c c c t	a a c a g c c c a g	t t c
g g c c c a c c c a	c c c a g g g c g c	t g a g g g a c c c	a c t
g g g g a g g a g c	c t c a g g t a g g	g t t a g g c c c t	g g g
g g g a g g a g c t	g t t c a g g g g g	a t g g g g c c t g	g a a
t g g g g g t t g t	c a g g t c c g c a	a g a g a c t g a c	a c c
t t g t c t g g a a	c a t c a a g g c c	t t t c c t c c c c	t g g
a g g a g g c g g c	c a c g c t g c c a	c c a g c a g c a g	g c c
g a a a c a g c g c	c t t c a g c t t g	c c t g a c a g g c	t g g
a c t t g a c c a a	g c g a g c a a a c	t t a a g g a c a c	c t g
t c c t a a g g a c	c a g c g t g c c t	a a g a c a c c t g	g a g
c c c c c a c t g g	c t g g g c a g c t	g t t t g c c a a a	c a g
g t t t g g a t g a	t g a c a t t t g g	t c t a c a c t g g	g c a

10

20

30

40

<210> 3

<211> 1794

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> complementary DNA

10

<400> 3

```

atgctgtccc gtgggtggtt tcaccgagac ctc
aagggccgag gtgtccacgg tagcttcctg gct
ttctcgcctct ccgtcagggt ggggggatacag gtg
gattttctatg acctgtatgg agggggagaag ttt
tacactcagc agcagggtgt cctgcaggac cgc
ccgctgaact gctccgatcc cactagttag agg
caggcagaga cgctgctgca ggccaaggggc gag
ctcagccagc ctggagactt cgtgcttttct gtg
ggctccccgc tcagggtcac ccacatcaag gtc
ggtgggtttgg agaccttcga cagcctcacg gac
attgaggagg cctcaggcgc ctttgtctac ctg
aatgcggctg acattgagaa ccgagtgttg gaa
acagccaagg ctggcttctg ggaggagttt gag
ttgcaccagc gtctggaagg gcagcggcca gag
attctccccct ttgaccacag ccgagtgatc ctg
tccgactaca tcaatgccaa ctacatcaag aac
aagacctaca tcgccagcca gggctgtctg gag
gcgtggcagg agaacagccg tgtcatcgtc atg
aacaatgcg tccatactg gcccagggtg ggcaigcagc gtgcttatgg gccctactct 1140
gtgaccaact gcgggggagca tgacacaacc gaa

```

20

30

40

```

ccgctggaca atggagacct gattcgggag atc
gaccatggggg tccccagtgag gcctggggggt gtc
cggcagggaag gtctgcctca cgcaggggccc atc
cgcacaggga ccatcattgt catcgacatg ctc
gactgtgaca ttgacatcca gaagaccatc cag
gtgcagacgg aggcgcagta caagtctcatc tac
actaagaaga agctggagggt cctgcagtcg cag
atcacctatc ccccagccat gaagaatgcc cat
cacaaggagg atgtgtatga gaacctgcac act
aagcagcgggt cagcagacaa ggagaagagc aag

```

10

<210> 4

<211> 595

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 4

```

Met Arg Trp Phe His Arg Asp Leu Ser
  1                               5

```

```

Leu Lys Gly Arg Gly Val His Gly Ser
                20                25

```

30

```

Lys Asn Gln Gly Asp Phe Ser Leu Ser
      35                40

```


Thr His Ile Arg Ile Gln Asn Ser Gly Asp Phe Tyr Asp Leu Tyr Gly
 50 55

Gly Glu Lys Phe Ala Thr Leu Thr Glu
 65 70

Gln Gln Gly Val Leu Gln Asp Arg Asp
 85

10

Tyr Pro Leu Asn Cys Ser Asp Pro Thr
 100 105

His Met Ser Gly Gly Gln Ala Glu Thr
 115 120

20

Pro Trp Thr Phe Leu Val Arg Glu Ser
 130 135

Val Leu Ser Val Leu Ser Asp Gln Pro
 145 150

Leu Arg Val Thr His Ile Lys Val Met
 165

30

Val Gly Gly Leu Glu Thr Phe Asp Ser
 180 185

Phe Lys Lys Thr Gly Ile Glu Glu Ala
 195 200

40

Arg Gln Pro Tyr Tyr Ala Thr Arg Val Asn Ala Ala Asp Ile Glu Asn
 210 215

Arg Val Leu Glu Leu Asn Lys Lys Gln
 225 230

Ala Gly Phe Trp Glu Glu Phe Glu Ser
 245

10

Asn Leu His Gln Arg Leu Glu Gly Gln
 260 265

Asn Arg Tyr Lys Asn Ile Leu Pro Phe
 275 280

20

Gln Gly Arg Asp Ser Asn Ile Pro Gly
 290 295

Tyr Ile Lys Asn Gln Leu Leu Gly Pro
 305 310

Ile Ala Ser Gln Gly Cys Leu Glu Ala
 325

30

Met Ala Trp Gln Glu Asn Ser Arg Val
 340 345

Val Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val
 355 360 365

40

Met	Gln	Arg	Ala	Tyr	Gly	Pro	Tyr	Ser
	370					375		

Asp	Thr	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Arg	Thr
385					390			

Asn	Gly	Asp	Leu	Ile	Arg	Glu	Ile	Trp
				405				

10

Pro	Asp	His	Gly	Val	Pro	Ser	Glu	Pro
			420					425

Leu	Asp	Gln	Ile	Asn	Gln	Arg	Gln	Glu
		435					440	

20

Ile	Ile	Val	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Ile
	450					455		

Val	Ile	Asp	Met	Leu	Met	Glu	Asn	Ile
465					470			

30

Asp	Ile	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Gln
				485				

Gly	Met	Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Gln	Tyr
			500					505

10

20

30

40

40

40

40

40

40

40

40

40

40

t t a t t t a g t t g t g t t t a g t g t a g a t t a a a t g t t

ttgtatgcgt ttgttttggg aaatagttgt ttagttagtg ggggagtagt ttagtttag 120

a t t a t t a t t t	t t t t t a g g t g	t t t t a g g t a c	g t t
a t t t t t t t t t	g t a g g t g t t t	t t a a g t t t g t	t c g
t t t t g a g a t c	g t t a g t t t g t	t a g g t a a g t t	g a a
g t t a t t t t a t	g g g t t t g t t g	t t g g t g g t a g	c g t
t t g t g t t a t t	g t t a g g g g g a g	g a a a g g t t t t	g a t
g a t t t a g t t t	t g g t g t t a g t	t t t t t g c g g a	t t t
t t t t t t t g t t	t t t t t a g g t t	t t a t t t t t t t	g a a
t t t a a t t t t g	t t t t a g g g t t	t a a t t t t a t t	t g a
t g a g a g g t t g	g a g t g g g t t t	t t t a g c g t t t	t g g
t t t t t t t t g a	g g a a t t g g g t	t g t t a g g g a t	t t t
g a g a g g t t t t	t t t t a t t g g t	t g t t t t t t t t	t a g
t a t t t a a t a t	t t c g t c g t t t	t g t t a g t t t g	a g t
t t t t t t c g g g	g g a a g g c g g t	t t t g g a t t a g	t a g
g t t g t a g g g a	a g t t g g t c g t	t g t g g g c g g t	t t c
t t t t g g a g a t	t a t t a g t t t a	g g g t t t g t t t	t t g
c g a g g a g g a a	g t g g t t g a t t	a t t g a g c g g t	t t t
t a g t t g t g t c	g t t g g t t t a g	t t t c g t t t t t	t g c
t a t a g a g a g a	t g t t g t t t c g	t g g g t a a g t t	t c g
t a g t t t t g g a	g g g a g g g a g g	g t t t t g t t g a	t g t
c g a t t t g t c g	t t g t t t t g c g	t t t g t t t t c g	g t t
g t g a g g a t t t	t c g g t t t a t t	t a t g t t t t t t	t g t
a g t g t g t a t t	t g t t t t t t t t	a t t g t a t t t t	t a t
t t t t t g t t t a	g g a t t t g t t t	t t t t g g g t a g	t t t
g t t a t t c g c g	a a g g t t t t t t	t a c g t t t a g t	t a a
t t g g t t t t a t	t t t t t t t g t t	t t t t t t t a t t	t t t
g t a c g t g t t g	a g t a t t t a t t	a t g t a t t a g g	t g t
g a a t a a g a t a	g a t a t g g t t t	t t g t t t t t a c	g g a
t c g a a t a a a t	a a t t t a a t a a	a t t g g a t t a t	t g t

10

20

30

40

tagatagittt tggtcgggtg tagtgggttta tatttgtgat tttagtattg tgggaggttg 1860

aggcgagagg	attgttttgag	tttagggagtt	tga
ttgttttttat	aaaaaaaaataag	aaatttagttg	ggt
ttatggagag	gttaagggtga	gaggttttgtt	tga
gatgattgta	ttattgtata	ttagttttggg	cga
aaaaaaaaaaaa	gaaaaatgaat	tagtttttata	tgt
attatttagtt	ggaggggatta	gggagggtttt	ttc
ggatgaggag	gaagaggaggt	tggttatatgtg	acg
gtagaggaga	tggtgagtata	aaagtttttaa	tgt
ttcgtggtag	aggatttttag	tggagcggag	gta
agttaggatg	ttgaaagtga	aaattttgacg	aga
tatttttggga	ggtcgaaggg	ggaagatttgt	ttg
taatatagag	agatttttatt	tttatttaaaa	aaa
tggtagttttt	agtagttttgg	gaggtttgagg	tgg
gattatttttg	ggtaatatag	ggagagatttt	tat
tatttaataaaa	tagttggatg	tagtggtatg	tat
aggtaggagg	attattttgag	ttaaggagggt	cga
gtatttttagt	ttgggttgata	aagtaagattt	ttg
gaaggaaaga	aggaaggggaa	ggaagaaaga	aaa
cgagaaagaa	gaaagaaaaag	gaagggaaggga	aag
aagtgatattt	tagtcgaaag	aagaaaggga	aga
gaaaaaaagaa	aaagtgataa	tcggtttgggt	atg
ttgggagggtc	gaggtaggtg	gattacgagg	tta
ggtgaaatttt	tgtttttaatt	aaagatatata	aaa
atttgtgagt	tttagtttatt	agggaggttg	agg
ggaggttgta	gtgagtcgag	attgcgtttat	tgt
ttttattttta	aaaaaaaaaaaa	aaaaagaaaaa	gaa
ggcgagtttg	tgggtgggtg	gttttttttagt	ttt
ttgttttttgt	tttagtgtat	atttttgtttat	tgt

10

20

30

40

gttttttgggt ttttgatttc gtttgigggtt atttttttgt taggtagitt ggtaggttt 3600

t t t t t g g t g t	a g a t t t t a t t	t t t g g t t t t t	t a g
g g g t t t t t a t	t t t t t a g a a t	a a t t t t g t t t	t a g
t g t t t a t g t g	g a t t t t g t g c	g t g t t a t t t t	t t t
g t a t t t t t t t	t t t t a t t t t t	t a t t a t g g g t	t g t
c g t t g t t t t g t	t g t a g t a t g g	t t g t t g g g g g	a a a
c g t g t t t t a t	t t a t t t t t t t	a t t t a t t a g t	t t g
t g a g t t t t a g	t t t t t g t t t t	t a a a a t t g g g	t g a
g a g g a t t a a t	a g t a t a a t g t	a a a a g t t g g t	a g t
t t a t a t t a g t	a t t t g g g a a a	t a t t g t t a a g	t t t
a g a g t a g t t t	t a g a a t t t t t	t a t a g a t t a t	t t t
t t t t t t t t g t a	t t a t t a t t g a	t t t t g a t t t g	t a t
g g a g t t t t a t	t t t g t t g t t t	a g g t t g g a g t	g c g
t t t a t t t t t t t	g a g a a g t t g g	g a t t a t a g g t	t a g
a g t t g g t t t c	g a a t t t t t t g a	t t t t a a g t g a	t t t
g a t t a t a g g t	g t a a g t t a t t	g c g t t t a g t t	g t a
t t t g t t a t t t	a g g t c g g a t t	a t a g t g g t a t	a a t
t a g g t t t a a g	c g a t t t t t t t	a t t t t a g t t t	t t t
a t t a t a t t t t g	g t t a a a t t t t	g t a t t t t t t t g	t a g
t t g t t t t t t a a	a t t t g g t g t t	a a g t a a t t t a	t t a
a t a g g c g t g a	g t t a t t g c g t	t t g g t t t t g a	t t t
a a t a t t t t t t t	t t t t t t t g a a t	t a t t a g g t a t	t t a
t t g t t t t t t g t	t t a t a a g a a a	a t g g g g a a a a	t g a
t t a a a t g a g a	t c g t g t a t g t	g a a a g t g a t t	t g t
a g g t a g t t t t	t t a t t t t t t t	g t t a a a g g a t	a g t
g t t t t t t t g g t	t t g a t a t t t t	t t a g a g g a a t	t t t
g t t t a g t t a g	t t t t t t t t t g g	g t g t c g a g t t	a a t
t g g a a g g a g t	g t t t t g g g g t	t a g g g t g t a g	t g g
a t t t c g t g t g	t g g t t a g a t t	t a t g t t t t a t	g c g

10

20

30

40

gtgtagggtgg atatggatga tgagggtgtgt gtgtgtgtgtat tgtgtgtgtat tttttgtttg 5340

c g t a t g a t a a	g t a g g t t g t g	t g t g t a g g a t	t a g
g t t a t g g a t t	g a c g a g t t t g	t t t g t t g a a t	a t t
t t t g a a t a t t	t c g a g a t g a g	c g a g a g c g t t	a g c
t a t g t g t t t t	t t t t g t t t t t	t g g c g t t g g g	c g t
g g g g t g g t g t	t t a a g t t g a a	g g g g t a g t t a	a a g
a g a t t t t t t a	g g g t a t t a g t	g a g a g a a g a a	a a t
a a g a a a a g t g	g a a a a g t t t t	t t t t g g g g g a	a a a
a t a a t g t a g t	t a t t a t g g g a	a a a t t a g a t t	t g t
t t g a a g t a g a	a t a t g t a t a a	t g t t t a t a a a	t a t
t t t t t t t t t t	g a a a t a g a g t	t t t a t t g t g t	t g t
g g t t c g t t g t	a a t t t t g g t t	t t t t g g g t t t	a a g
a g t t g g g a t t	a t a g g c g t t t	a t t a t t a t g t	t t a
a g g g g g t t t t	a t t a t g t t g g	t t a g g a t g g t	t t t
t t t g g t t t t t	t a a a g t g t t g	g g a t t a t a g g	c g t
t t t a t a t a t a	t t t a t g t a a a	t a g t a t t t a g	a t a
a a a g t t t t t t	a g a a a t t g t t	t t t a g t t a g t	a t a
t a t t a t a t a a	t a t t t a a a a a	g g t a t g t a g a	g a a
t a g t t a t t t a	g t t t t t t t t t	t t a g g g g a a g	t t a
g t t g a g t t g t	t t t t t t t c g t	t t t g g t t t g g	c g g
g t a g g t a g t a	t t a t a t a t t t	t a g t g t t t a g	g g t
t t a g t t a t g g	t g a g g a t t t t	g t t t t t t a g t	t t t
t t g g g g t a g g	g t a g a g g t t t	a g g g a t a a g a	a t t
t t a g g g t t a t	g t t g t t t a t t	t t t t t g t t a t	a g t
a g a g g a g g g t	a t t t t t t t t t	t t t g t a a g t a	t t g
t t t t a t g g t a	g t t t t t t t g g	a t a a g g a g g t	t t t
g t t g g t g t a t	a g g a g t t t a a	a g t a t t g g t t	t t g
g g t a t t g t a g	t t g a t t t a t t	g a t g g a t t t a	g g t
t t t t t t g t t t	g t a a a a t g a t	a a a g a t a g t t	t t t

10

20

30

40

attagataag gtatgtgaac gttattatag tatagcgttc ggtattitagt aggattitatt 7080

c g a t g a t a g t	t g t t a t c g t t	a t t a t t g t t a	t t a
g t a g t t g g t g	g a g g a g g g a g	a g a t g t c g t g	g g a
t a t t t g g g t t	t g g a g t g t g t	a a g g t a t a t a	t g t
g t g t a a t g t t	a t g t t t t t g a	g t t t t t g a t t	g t a
a t t t t t a g t g	t t a t t t t t g t t	t t g t t t t t t t t	t t t
a a g t g a g t t t	t t t t a a g g g g	t c g g t c g c g t	t t t
t a g g t t a g t g	g a g t g g t a g t	t t t a g a a t t g	g g a
a t t g g g a g t t	g t a t t t t g a g g	t t t a g t t t t t t	g a g
t t t t t t a t t t	t t t g c g t t t t	t t t t t t t t t t c	g g a
t g t t a t t t a c	g g t a g a t a g g	a g g t a a g g g t	g t t
t t t t g t t t g g	g t c g t t t a g g	t g g t t t t a t c	g a g
t g t t t a a g g g	t c g a g g t g t t	t a c g g t a g t t	t t t
g t g a t t t t t c	g t t t t t t c g t t	a g g t a g g t g g	g t t
t t t t t t g t g t	t a t t t a g g t t	t t g a a t t a t t	t a t
t t t c g t t t g t	t t t t t t g t t t	t t a a t t t t t a	t a t
g t t t a t g t g t	g t t t t t a t t t	a g g a t t t t a g	t c g
t a t c g a t t g g	t t t t a t c g t t	t g g t g t t t t g	t a g
g a t t t a g a a t	t t a g g g g a t t	t t t a t g a t t t	g t a
a g a g t t g g t g	g a g t a t t a t a	t t t a g t a g t a	g g g
t a t t t a t t t t	a a g t a t t c g t	t g a a t t g t t t	c g a
t a t t t t c g t t	a t t t t t a a g t	a g g g a t g a g t	c g g
g g g a g a t t g g	t a g t c g g c g t	t g t t t a t t t t	t t a
g t t t t t a a t g	t t t t t t t t t t	t t g t t g t t t t	g g g
a t t t t t t t t a	t t t a a t t t c g	a g g a a g t t a t	a g a
t t g g t c g t t g	t a a t t t a g g t	t t t a t t g g a g	a t a
t c g t g t a g g t	t a g t t t t g t t	g t t a g a a a g t	t t t
t t t c g t t t g t	t t t t t a t t t t	a g t a t a t g t t	a g g
g a t g g g g a t g	a a t g t t t g t t	a a g a t a t t t g	a t g

10

20

30

40

egtttgtttt gtggggttaa ataggttttc ggtttaaata gagattattg agagtacgat 8820

gtgaagtgtt	tatttgtgta	aagtgttttta	cgt
gtattttttt	tttgtggttt	tttcgattttt	ttt
ggttgggggt	tttgaatgtt	ttttatgata	tta
tgtttagattt	tttttagagta	aagggtagcg	gaa
tttggggttaa	gtcgaatttgt	ttttgtcgtg	gat
atgatacggga	attttgtttt	tgtttagtttg	tag
gtatttaatat	tttttggttaa	ggtaattgatt	gaa
agtttttgtgg	tttattttggg	aggtttttttt	ttt
ttttttttgtg	agtttttata	ggttgggtttc	gtg
tcgtaataatt	taggggggttt	ttgggtatcga	gat
tttttgttttt	agtttaggaga	ggaggacggg	ttg
gtaggggtttt	aggagggtttt	tgtagaggag	gtt
agagagagaaa	ggaaggggagg	gtagtgtcgg	ggc
tggaagggtttt	tttggggtgat	tcgtttttagg	agt
gtgagagggtt	ttttttttttta	ggtttttgtttg	tgt
tttgcgagaaa	tttgtattttg	ttttttcgggtg	gtt
ttgtatggag	attttttttat	tttgggggttt	gag
tttgggggttt	tagttttgttt	ttaggcggtg	ggt
tttgggggggtt	tttcgggttgg	agttatttttc	ggg
ggttttttttt	ttttttttttt	tatttttttgcg	gtt
tttggggttga	ggaaaattttta	taatttttatt	ttt
ttttttttttat	tacgtgggttt	tttgtgggggt	tgg
ggaaagggggt	gtgttttcggg	gaaagggttt	agt
aaatttcgttt	gaatttttggg	ttttttttttta	gtg
ttataattatt	tttttttttag	tgggggttgtt	ttt
ttcgttttttt	ttgtgattttg	agttttgtgtg	ttt
ttcgggttttgc	gtttttttttt	gttttttgggtt	ttt
agattttattt	ttagttttttt	tttttttaaat	att

10

20

30

40

tagaggiggg tttiggggtc gaagttcggg tagaattttg gaggttagga tggtttgaat 10560

t t g g g a g g t c	g a g g t t g t a g	a g a g t t g t a a	t c g
g a g t t t t g g a	a g t t t g t t t t	a g a g t t a g t t	a a g
g c g t t a g t t t	t t t t a t t t a t	a a a a t g g g g g	t a a
t g a g a g a t t t	a a a t g a g g t g	g t g g a t t t g g	a a g
a g g t g t t t g a	t t t t c g g t t t	t t t t t t g t g a	a t g
t t g g g t t t t a	t t t t t t t t g a	c g t t g t t t t t	t t t
g g g t a g g t a g	a g a c g t t g t t	g t a g g t t a a g	g g c
a g t t t t a g t t	a g t t t g g a g a	t t t c g t g t t t	t t t
t t a g g t t t t t	c g t t t a g g g t	t a t t t a t a t t	a a g
g g c g g g g g a g	t t t t t g t t g a	g g t t t t t g t t	t g t
t t g t t t g g g t	t t g a a t t t a a	g g t t g g g g a t	t t a
g t t t a a t t t g	g t t t t t t t t a	g g g t g g a c g t	t a t
a g t t t t a c g g	a t t t g g t g g a	g t a t t t t t a a g	a a g
t t t g t t t a t t	t g c g g t a g g t	t a g g g g t g g g	t t t
t t t t t t a g a t	g t g a g t t t t t	g g g a t t t t t g	a g t
a g t c g t a t t a	t g t t a c g a g g	g t g a a t g c g g	t t g
a t a a g a a g t a	g g a g t t c g a g	g a t a t a g t t a	a g g
a t g g t g g g g a	t c g g t a g g g t	t g g g g t a g t t	g a g
c g g a t a t t t t	t t t t t t t t t g	t t t a t t t t t g	t t t
a t g g a t g t t t	t t t t t g g g a g	t t g a t g t t t a	t t t
a g t a g g a g g t	g a a g a a t t t g	t a t t a g c g t t	t g g
a g a a t c g t t a	t a a g a a t a t t	t t t t t t t g t g	a g t
a t c g t t t t t g	t t t t a g t t g t	t t t t t t t t a t	t t t
g g g t t a t t t t	t t t a t a t t t t	t t a t a g a g t t	t t t
t t a g a a g t g t	t t t t t t a t t a	t t a g t a g g t a	g g t
a t t t t t t t a t	t t t t t t t a t a	t a g a t g a t t t	t t t
g t t t t a t g g t	t t t t g a g a t t	a g a a t g g t t t	g t t
g t g a g t t t t t	g g t t a a t t t a	g a t t a t t t c g	t t t

10

20

30

40

agtcgagiga tttttagggg acgggatagt aatatitcgg ggttcgatta tattaatggt 12300

a a t t a t a t t a	a g g t t a g t a g	t g t g g g t t a c	g t g	
t t t g t t t g g t	g g g g g g a t t t	t a g a t t t a g a	g a t	
t g t a t g g g t g	a g g g t g g t a g	t g g t t t a g g g	t t t	
g g g g t g c g t t	t t t t t a c g t t	t g c g t t t a g a	a t t	
a g a t t t a t a t	c g t t a g t t a g	g g t t g t t t g g	a g g	
c g t g g t a g g a	g a a t a g t c g t	g t t a t c g t t a	t g a	10
t a g g g c g t t t	t t t t t t t t t c	g t a t t c g t t t	t c g	
g a g t a g t t a g	a t g t t a g g g t	a g a a a g g g a t	t t t	
a a a t t g a g g g	t t a g t g a t a a	a g t t t c g a t t	a t a	
a t t t t t g g g t	t t t t t t g a g t	t t t a g a t t t a	g g t	
t t g t t t t a t t	t g t t t g t a t t	t a g g t t t t t t	t t g	
a g t t t g t t t t	t t a t t t t g t a	g g t t t t t t t t	a t a	
g a t t t t a t t c	g t g a t a t a a a	t t g g g t t a a g	t t t	20
t t t t g g t t a t	t t t t g g g a t a	a a g t c g t a t t	t t a	
t t t t t t t g a t	t c g t a t g t t t	t t t t t g a a g g	t t t	
a g g t t t t t a g	t t t t t t t t t g	t a t a a g t t t a	t t t	
t a t t t t t g t t	t g g t a g a t g t	t t c g t t t t t g	a a g	
g a a t t t a g g t	t t t g t t t t t t	t t a g g a t t t a	g a g	
t t t t t a g c g c	g g t g t t t t t t	t c g g t t a t t t	g t t	
a t a g a t t g g g	t g t t a t t t g t	g t t t g t g a a g	t t g	30
g t t t g t t t t g	g t a a c g t t t g	t t g a a t g a t a	a a c	
g t t t t a t t a t	t t g t t g g t g g	t t g a t t t g a g	a c g	
a g t t t a t t c g	t t t a t t t a a t	a a a t g t t t g g	g t c	
g g a t t t g g g a	t g g g t t a t a g	t g t t t t g t t t	t g t	
t t a g a a t a a a	t g c g t t t t a t	a t t g g t t c g a	g g t	
t t t t g t g a t t	a a t t g c g g g g	a g t a t g a t a t	a a t	
t t t t t c g t t g	g a t a a t g t g a	g t g g t t t t t a	c g t	40
g g a t t t g t t t	t t t t t t t t g g	t c g g g t a g g g	t g a	

ggggtatiga ttttaigtitt tgggtttagg gagattgat tggggagatt tgggtattatt 14040

ag t a t t t g a g	t t g g t t c g a t	t a t g g g g t t t	t t a
t g g a t t a g a t	t a a t t a g c g g	t a g g a a a g t t	t g t
g t a g g t g a g g	a t g a t a a t t t	t g a t g g t a g t	a g t
t g t t a t g a g t	t g t t a t a a g t	a a t a t a a a c g	t t a
t t t t c g g t t t	t t t t t g g g t t	t t t t t a t g g t	t t t
t t a g t t t t a t	t t t g g t t t t t	t g t t t g t g g g	t a t
t a t t t c g t t t	a a t t t t g t t a	a a t a t a g a g g	a g g
t t a a g t t a g t	t a g g g t a a g g	t c g g g t a g g t	a t t
c g t t t t t t t t	c g a g g t t t t a	t t t t g t t g g t	t t t
t g t t t t t t a t	t t t t t t t t t t	t t t t t a t c g g	t a g
t t g t t t t t t t	t t t t a g t t t t	t t t a g g t a g t	g t t
g a t g g g t g a t	g t t t t t t t g g	g g t t g t a t a t	a a t
t g a t t a g g a g	a t t t t t g g t a	a g g t g t a g a g	g t g
a t a g g t g a g t	t t a t t g a g t t	g g t t t g g t t t	g g g
t t t t c g t t t a	t t a g t t g t g t	g g t t t t g g a t	a a a
t t t t a t t t g t	a a a a t t a g g a	t t t t a g g g t t	g t c
g t g g t t g g a a	t t t c g t t a g t	t t t t a a a a a t	t g g
t t a g g t a g a g	a a t a g g g g a a	t g g g a a t t t g	t t t
t g g a t t t t a g	g t t t g c g a c g	g t t t t t g g t t	t t t
t g g g a t a g g g	t a a g t c g g t t	g a a t t t a g a g	g t g
t t t t g t t t t g	t g t t t t t t t a	g g g a t a g g t t	t a t
g t t a t a t a t a	t a t t t a t a t a	t t t t t t g a a a	g t t
a a g g a a g t g g	g t g t g g g g g g	t t a t t t t t g a	t a a
t t a g g g t a t t	a g t t t g t t g g	g t t t a g t t g a	g g g
t t g t t t a g g g	t t g g g a a a g g	a g a g a a a t t t	t t t
t t t t g t g t t t	t c g t a t t t t g	t t g t t t t a g g	g t t
g g a a a a g g g a	a g t g a a g t t a	t g t t g a g a g a	c g t
g a g g g t t t a g	g g t a t t t g g g	a g t c g g t a g g	a t a

10

20

30

40

```

ttcggggtgg gggtagttat ttattaggag tgaggagtcg gcgcgaggag tggaggagg 15780
aaggatggtg gtagttgggg agttagcgtt agt
tatgtagagt tgggtaaaatt ttattatta ttt
ttattattgg aggttttaggt tgttttttgtg gtg
tttttttttt cggggagggt ttgattgggt ttt
cggtatcgggt cgtataggta ttattattgt tat
taagggtgag gggtaatttgg gggttttgggg gtg
ttatgttttg aattgagggt tgattgtttt tta
ttagaagatt aattagatgg tgcgggcgta gcg
gtataagttt atttacgtgg ttatcgttta gtt
ggtttttgtag gtgcgtgtag agtaggggttt ggg
gtgtttatttg gttttgtttgg gattattatt ttt
aagggttagg agtcggagta cgggaataatt att
gttaagggttt ttcgtattttc gtttaagtga gtg
ttttttttgt ttgttttaggt cgattttttat ttt
gggattttggt ttttaagtttta ggttttgggttt tta
gtgtttatac gtgtgggttt ttgttaggta tta
ttttgttttt taggagtttg gagtttagtg tag
ggggtgggta gaggggattg ttagtggtcgg gtt
aattgtttgt atttgttttt ttgtatttcgg ttg
tttgtaattt aagaataaga gggaggagaaa agt
gaagagtaag ggtttttttta agagggaagtg agc
agtttttttg tttgggtgtt tttttttgttt tgt
ttgggtggat ggggtggtcg tagtttttatt ttg
gttttatttt taggttttag ttatttttttt att
agttttgatt ttgtggaagt atttcgcgat gga
ttttattttt ttgtaattta aatgggttgta ttt
agtttagtta ggtttttaggt agggtttaatt ttt
tattgtgtgt cgttttttgag tttttttgttt gtt

```

10

20

30

40

taggaigggg aatigtgtgt gttttcgtgc gtgtttcgcg tgaaagtttc gtttttcgtt 17520
agacgggacgt ggggtcgggat ttcgttttcgt acg
ttagttttttt ttttttaaaat ggaggggcgat tat
atgacgggttg acgataagac ggggtatagtg att
attaaaagat tatatacgtt agttttagttt agg
gcgggaaattg agggatagaa aaatttaagta att
atggaatagtg gaggttggga ttcgaatttta ggt
atttttggagt tgtagttaggg gttatttttta ggg
gagtttttaga tttgaatttaa gaagagtagt taa
ttcgggttgcg ttttttttttg cggggaatagg gat
tagtttttttt tttttatttag gtcgttggtg ttt
ttgggttgacg tgaagagtggt tttgttttttt gtt
gggggtttttt tttttatttga aatatattggtg ttt
tttttaggaag tgttggcggtt tatttttttggga aag
agagggttggg cgtgtatttat ttagtaaaatt ttt
atagttttttc gattttttttg aattttaggag gtt

10

20

<210> 6
 <211> 18404
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> bisulfited genomic DNA

10

<400> 6

```

ttttttttgat tagttttttta agtttttagga ggt
ggggggttttg taaggatttg ttgagtaatg tac
gttgtttag ttttttagg agtggcggt agtattttt gagggatgat tttatcgg 180
tttattttttt aggatattag tgtttttaaat aaa
aaggaagagg ggataaaaaaa taaagtatttt ttt
taagaggata agggtagtag cggttttggat gag
ttgaggagtt tgttttttgtt ttcgtttagag ggg
gtttttcggtt gtttaattatt ttttttagatt tag
gattagggtt ttttttgaggg tggtttttagt tgt
gggggttagat agttttgggtt cgaatttttag ttt
gtaagtgaatt aagttatttta gtttttttttgt ttt
tgatagaagt gtttagatttg aattaacgtg tgt
agcgtgtgat gagttatttgt gttcgttttta tcg
attatttttgt tatgatacgtt ttttattttta aag
ttatttttttt acgtgcgagg cggagttttcg att
tttacgcgag gtacgtacgg aggtatatat agt
tttattttatt gggtaagtaa agggttttaga ggc
tataagaggga gaagggttggt ttttggtttgg ggt
agagggtgggg gggaatgtagt tattttaaat ata
ttgtgagttt gtttatcgcg aaatgttttt ata

```

20

30

40

gggagtgagg	gagtgagagg	gtagttaggaa	ttt
gttgggaagt	atagaatgag	gttgcggtta	ttt
aaggatatag	ggtagggtag	ggaggatatt	tag
aggatagtatt	cgttttatttt	ttttttgaggg	aat
gttggtttttt	tattttttttt	tttttttttgt	ttt
tttttgtgttt	gtagtcgggt	gtaggggggggt	aag
tagtatagggg	ggattcggta	ttggtagtttt	ttt
agttacgggtt	tttggtatttag	atttttaagt	ttt
gagtgcggttg	ttgggtatttta	gtagagggttt	ata
aatagaagggg	gtgagaatta	agttttgaatt	tga
gtttttttttta	gaaagtgagg	atcggggttgg	gta
gtagtiagggt	ttattttttt	ggacgagggt	cgggaggttt
ggataggggt	tttttttttt	tggtatgggt	attttttatg
gttggggggat	aggtgatgttt	ttcgtattttc	gat
agggatagtg	ggaagggtggt	ggtttttagta	ggg
tttttttttttt	tttttaggttt	tgtttttgtac	gta
tggtttttaaat	gaattggggcg	atgggttacgt	aga
ttatgtttcga	gcgtttgcgtt	cgtatttattt	gga
ttagggtttgg	gtgggggggta	gttaaaatttt	agg
tgttttattttt	ttatttttttaa	atttttttaggt	gtt
tgagtatgttc	gatgataaatg	atgggtgttttg	tgc
ggggtgtttat	tagagggttag	ttaaagtttttt	ttc
ttagtttttag	gtatttatagg	agtagttttga	gtt
ggttatcggg	taagtgatga	tggagggttttg	ttt
ggtttttgagg	tgttgacgtt	ggtttttttag	ttg
gcgtcgaattt	tttattttttta	gtgagtggttt	gtt
aatttttattta	ttgtttttgtc	ggtttttttagg	tat
ggagttaatgg	agcgttttttt	agtattgggttt	tat
agggaaggga	tagtttttgag	atagtaggggt	gcg
agtagtgtag	taggaagtttt	tttttttttttt	tta

10

20

30

40

```

t t t t a g g t t t   a t t t t t a g t t   g a g t t t a g t a   a g t
t t a a a t t t a g   a t t g t t a a a a   a t a a t t t t t t   a t a
a a a g g t t a t g   g g g t t t t t t a a   g a a g t g t g t g   a a t
a g t t t t c g g g   g a t g g g t t t g   t t t t t g a g a g   a g t
t t t a t c g g g g   g t a t t t t t t a g   a t t t a g t c g a   t t t
g g g g a a g a g g   a g g a a g t t a g   a g g t c g t c g t   a g g
g g a t c g g g g t   a a g g t a g g t t   t t t a t t t t t t   t a t
a g t a a t a g c g   t t t a g t t t t t   g a g g g t t g a c   g g a
t g a g t t t t t a   c g a t a a t t t t   g a g a t t t t t g a   t t t
a a g t t a a g t a   a t t t g t t t t a a   g a t t a t a t a g   t t g
t t t t t t a t t t   a t t t a g g t t a   g g t t a g t t t a   g t g
t t t g t a g t t t   t t a t t t t g t   a t t t a t t a g   a g g t t t t g
t a g a t a g a g g   a g t t a t g t g t   a g t t t t a a a g   a a g
g g t t a g g a t g   g g g t a t t g t t   t g g g g a a g t t   g g g
a a g t t t t g c g   g t t a t c g a t g   g a a a a a g a g g   a g g
t t t t g g g a g a   a g a a a t t a a t   a g a a t g g g a t   t t c
g g t t t a t t g t   g g g t g t t t g t   t c g g t t t t g t   t t t
g g t t t c g g g t   t t t t t t t t t g   t a t t t g g t a g   g g t
t t t t g a g g a a   g a t a t t t a t a   g g t a g a g g g t   t a a
t t t a g g g t t t   t g g a g t t a t g   a g g g g a t t t a   g g a
a a t g t g c g a g   t t a a c g t t t a   t a t t g t t t a t   a a t
t t t t a g t t g t   t a t t a t t a t t   a t t a g g a t t a   t t a
t t t t g c g t g a   g g t a g a t t t t   t t t g t c g t t g   g t t
t t t a g g t t t a   t t g g g g a t t t   t a t g g t c g g g   t t a
t c g a a t t a g g   t t t t t t t a a g   t c g a g g a t a t   a g g
t t t t a t t t a t   t t t a t t t t a t   t c g a t t a g a g   a g g
a a t g g g g t a g   g g c g t g g g g g   t t a t t t a t a t   t g t
g t t t g t a t t c   g g t t g t g t t a   t g t t t t t c g t   a g t
g t t g t a t g t t   t a t t t c g g g t   t a g t a t g g g a   c g t

```

10

20

30

40

ggggatgagg	tatagagtag	ggtattgtgg	ttt
tgtttggtat	cggttttaaat	atttggttgga	tgg
atttggggttt	tcgtttttaga	ttaattatta	ata
tcggtatatt	cgttttgttat	ttaataaacg	ttg
tgtaaatatt	atagtttttat	agatataaat	aat
gagttttatag	agatagggtga	tcggggggaga	tat
cgtaaatTTTT	tttttagggtt	ttggaggga aa	taa
ttcgggttggtg	ttttttaaaaa	cgagggtatttt	gtt
tttttagtag	aaaatgaggtt	tgtgtaaaga	aag
ttggggggcgg	tgagtttttta	agagaagcgt	gcg
atgttagggtt	ttagagtgcg	attttattttt	aaa
tagaaaggaa ggaattigat	ttagtttgig ttacggaigg	gattattita atggtagtat	5400
agaggggtggtt	gtgtagggggg	agttttgtagg	gta
ggtaggggagg	ataggaggggg	tttggaatgta	gat
gatagttttgg	aatTTTgggtt	tggagtttttag	aag
gggttacgtt	gtgtagtcga	gatttttgttta	tta
tttttatTTTT	tgagattTTTT	ttttgttttttg	gta
gattataagt	acggggggcgg	atgcgggggaa	ggg
tttttcgggtg	gttatgacga	tgatacgggtt	gtt
attgatcgtg	gttttttagat	aatTTTgggtt	ggc
gttttagtagt	tggtttttgga	cgtaaagcgtg	gag
tggttttagta	taggtttttga	attattgttta	ttt
tttgtttttagt	tgttttttgga	tttaggggttt	ttt
gttttttttttt	ttacgtgggtt	tataattgttg	att
gatttcggggga	tgttatttgtt	tcgttttttgt	agg
gggcggagag	gaggcgagat	ggttttgggtt	agt
tttttttgagt	taatagggtta	ttttgggtttt	aga
gtagtaggggg	tggggggatta	tttgatatgga	ggg
agtaggggggt	aatTTTgtttg	ttgggtgggtgg	gga

10

20

30

40

t t g g a g a a g g	g g g a g g t t t t	g t g g g g g g t g	t g g
t g g a g a t t t g	t g a g a t g a g g	g g a g g t a g t t	g g g
g t a g t t t t g g g	t g t t t a t a g g	g g a g a a t g t t	t t t
t c g t t g t t t t	t t t a g a c g t t	g g t g t a a g t t	t t t
t g t g g g t g g g	g a a a t g a g t a	t t a g t t t t t a	a a g
g g g t g g g t t a	g g a g t a g a g g	t g g g t a a g g a	g g g
g t t g t t a t t a	t t t t a g t t g t	t t t a g t t t t g	t c g
t t a g a a g t t a	g t t t t g g t t g	t a t t t t c g g a	t t t
g t t t t t a a t g	t t a g t c g t a t	t t a t t t t c g t	g g t
a g a a g t t a g t	a a t t t a g a g a	t t t t a g a a g t	t t a
g g g a g g t a g t	t g g g t t t a t t	t t t g a t t t g t	c g t
t t a a t t t c g t t t t t t g a a	a t g t t t t a t t a g g t t c g t g a	g g t t g t c g a a g g t t t t a a a	7140
t t a t t t a t t g	t g t a g c g t t t	a t t t t g g g g g	g a g
g t t t t t t t t t	t t g g g t t t t t	a g t t t t g a a t	t t a
a t a t t g t g g t	t a t a g a t a g g	a g t t t t a g t a	g a g
t c g t a t a t g a	t t t t g a t g t g	g g t g a t t t t g	a g c
t t a t t g a g t a	t a g a a a g t a c	g a a g t t t t t a	g g t
g t t t a g g g t t	c g t t t t t g g t	t t g t a g t a g t	g t t
t g g t a t t a t t	t a g a g a a g g t	a g c g t t a g g g	a a g
t t g a g t a g a g	a t a t t t a t a g	a g a g g g g t c g	g a a
t g c g t t a t a t	g t t t t t a a a t	t t a t t a t t t t	a t t
t a g g t a t g a t	a t t a t t t t t a	t t t t a t a g a t	g a g
g g t t t a g g g t	t t t t g a t t g a	t t t t a g g g t a	a g t
g t g t a g t g g c	g c g g t t a t a g	t t t t t t g t a g	t t t
t t t t t a g a g t	t t t a a t c g g g	t t t c g a a t t t	a g a
g t a a t a t t t a	a a a t a t t t g g	a g g a g a g a a g	t t a
t g t g t t t t a g	t a g a g a t t a g	a g g t a a a g a g	a a a
t g g t g g g a g a	t g g a t a t a t a	g a t t t a a g t t	a t a
a g g g a g g c g g	g g a a g a t a a t	t t t a t t g g g g	a a a

10

20

30

40

ttggatgatg	ttattgaagg	ggagttttagg	gtt
tagaaagtag	aattaagttt	tttttttcgaa	gta
ttttataaag	tttagtttta	taggaaatta	cgt
gggagagagt	gagaagtgag	gttgtagagg	ttt
gtaaatTTTT	taatcgtagg	gatgggggga	agg
ttttattttt	gttcggagg	gatttttagtc	gag
gggttatttt	agttttatcgt	ttgggggatag	gtt
gagttttttt	tttttaggttt	taggatgagg	aag
aggaagcgta	gagttatcga	gggatagatg	taa
taaggtagag	gatatagtag	aattttgggag	aaa
gggtgatatt	ggttttttggg	acgggttatt	taa
tttaattttt	cgtttcggta	ttgtttttt	ttttttttga
8880			
atttaggttt	tagttttttt	tgtagggggtt	ttt
taggtatttg	ttagtttcgtt	ttttttttttt	ggt
agtttttagag	ggttttcggtg	ttaaaagttt	ttt
taggggggtag	atacggagtt	agttatgtga	ggt
aggtcgaattt	aggaaaggag	gttttttttagg	tgg
tagtttttaag	ttttaatttag	tgtttttgatt	aaa
tttttagagag	gttgtaagt	ggtaggagta	agg
tgaatgtagg	gatttacggt	aagggttaagt	cgg
tttttagcgtt	atttcgttgt	ttttttattttt	aag
gaaaggagtt	atgggtgttat	gaggagttatt	tag
gggagattat	aggaggagtc	ggggagggtta	tag
tgttcgggat	agcgtgagat	atttttatata	ggt
ttttttgtttg	ggtcggagat	ttattttgatt	tta
ttgggataag	gtatttaagt	tttttggttaag	tat
tttttttattg	ttttaatatg	tgttgggggtg	agg
ttagagggaag	aagagttttt	taataataga	gtt
agtgggttttt	ttgttttttag	tgggatattgg	gtt

10

20

30

40

c g a g g t a g t t	t t t t g t g g t t	t t t t c g g g g t	t a g
a g a t a t t a g g	t t t t a g g a t a	g t a g g g a g g a	g g g
a g g g g a g g g g	a t g g a g g g t a	g g t a g t g t t g	g t t
t a g g g t g g g a	g t c g g t t t a t	t t t t g t t t g g	g a a
t a t t a g t g g g	a t c g g a g t a g	t t t a g c g g g t	a t t
t t t g t a g g a t	a t t t t g t t g t	t g a g t g t a g t	a t t
t t t t t t t t t t	a t a t a g g t t a	t a g a a a t t t t	t t g
g a t t t t t t a t	t t t g t a g g g t	a t t a g g c g g t	g a g
a g g g t a g g g a	t c g g t t g a g g	t t t t g g g t g g	g g g
a g g g a t g g g g	a g t g t g g g g g	t t g g g g g t a a	g g g
g g g a a t t a g g	a a t g a g t g g t	t t a g g g t t t g	g a t
g g g t t g c g g g	g g g t t a t t t	a t t g a c g g a	g a g c g a g a a g
g g g t t g a g t t	a g g a a g t t a t	t t a t t t t g g t	t t t g c g a t t
t t t a t t g a g g	t t t c g g t g a a	c g t g g a t a t t	t c g
c g t g g g t a t t	a g g t a t t t t t	a t t a t t t g g g	c g g
t t t t g g g g g t	t t t c g g a g a g	g t t t t t t g t t	t a t
t a g g t a g a g a	g t t t a g g g a t	g a a g g g g g c g	t a g
a t t t t c g g t g	g t t t t a g t t t	t a a g t t t t a g	a t g
g g g g a t a g g a	a g a g g c g c g g	t g g g g t t g t t	a t t
a g t a t a g t a a	g g g a a g a g a a	t c g a t t t t t t	g g g
t t t t a t a c g t	g g g a a g a g a a	g t a g a g t a g g	g t g
g t a g t a a g g a	t t g t a a t t a a	a g g t t t a g g a	g t a
a a t t t a g a c g	t a t a t g t g t g	t t t t g t a t a t	t t t
t t g g t t t a c g	g t t t t a c g g t	t t t t g t a t a t	t t t
t g t c g g g c g t	t t a a t a a t a a	a t t t t t t t t t	t t t
t t t t a t g a a a	t g t g t t a t a a	t g a t g g c g g t	g a t
t t t a a g g t a t	t a g g g g t t a t	t g g c g t t t a t	a t g
t a g t t c g g t t	t g t t t g a g t t	t t t t a t t a t t	t t a
a a t a g a g a t t	t t a a a g t t a g	t a t t a g t g a g	t t a
	a a g a g t t t t t	t g t t t t g a a t	t t t
		t t g t t t a a a g	g g g

10

20

30

40

taagatttttg	ttaatgttttg	taagagagaaa	ggg
ttgttttatgt	tattgtggta	gaggggatgga	taa
gggtttttttt	taatttttttgt	tttttaggttt	ttg
ttttattttttt	ggggggttggg	ggataagggtt	ttt
tgatttttaga	ggtttttaaat	attaagggtat	atg
aaatatattaat	atcgtttaaat	taaaaacgagg	aaa
atatatatattg	gtgggttttttt	ttaggggaggg	aaa
gagatatatttg	gttttttttata	tatttttttttg	aat
ataaaaaataaa	atatgtttaaat	tgggaataaat	ttt
tttttttgtttt	ttattttggat	gttggttttgta	tgg
cgtagtggtt	tacgttttgta	atttttagtat	ttt
gttaggagat	cgagattatt	ttgggtaata	tggtgaaatt
tttttttttat	taaaaatata	12360	
aaaaaaaaattag	ttggggatatgg	tgggtggggcgt	ttg
taggagagaatt	atttgaatttt	aggaagtcga	ggt
atttttaggttt	ggtaatatag	taagattttta	ttt
ttgtgtgtgttt	aatatatttatg	aatatattatgt	atg
ttttaaggttt	aataaggttta	atttttttttat	gat
aaatatattaat	gttttttttttt	aaaaaaagggtt	ttt
atttggtttttt	ggtttttttttt	tttttatgtggt	ggt
gtatgggtttta	gttttttgattta	tttttttttagt	ttg
gcgggaattttt	tacgttttaac	gttaaggaggt	aag
gcggggatatatt	cgttgggcgtt	ttcgttttatt	tcg
ggtaattgaggt	aagtgttttaa	taataaaggtt	cgt
agtatatagttt	tttgggttttta	tatatatatagt	ttg
tatagtttata	gtatatatatat	tttatattattt	atg
gtatatattttt	acgtatggaa	tataaaattttg	att
gtatttaaaccg	tttatattgtat	tttgggttttta	aga
ggtgggaagg	aattaatctcg	gtattttagaa	gaa
tggaagagggt	aggaatttttt	ttgaaggggtg	tta

10

20

30

40

gtatagttttt	tgttatttttt	tggtaggaaa	ata
gtgtgggggtt	tgtagatttat	ttttatatatat	acg
tgatgtagga	attattttttt	ttattttttttt	atg
aattataaga	gtaaatgttt	gataatttttag	aag
gataaaaagta	gagatttaagg	ttaggcgtag	tgg
ggggggtgagg	ttgggtggatt	atttgatatatt	aag
aaatttttgtt	tttataaaaaa	atataaaaatt	tag
tttaggtatt	tgggagatttg	agatggggagg	atc
agtgagtttat	ggttggtggtta	ttgtaatttcg	gtt
aaaaataaaaa	atatagtttgg	gcgtagtgat	tta
tcgagggtggg	aggattatttt	gaggtttagga	gtt
ttttattttt attagtttgt	aaatttagtt ttttaggagg	tggaggttgt agtgagtcga	14100
gatttatgttta	tcgtatttttta	gttttggggttaa	tag
aattaaaaaat	tatatatagatt	aagatttaattg	gtg
gtaaaataagg	taaaaataatt	tgtagaaaggt	ttt
gttttgataaaa	tgagttttaat	aatatattttttt	aaa
agggttttttag	tgtttgtttagt	ttttatatatta	tat
gtaggtgttta	tttatatttaat	tttagaaata	gaa
gttttaagggtt	ataagtttagt	gagtaggaag	gtg
gttttggtgtt	tttttttttttta	ataatttatat	tgt
tgggtatttgt	tatatagttttat	gatggaagggt	gga
tgggttaggg	taaagagggtg	gtacgtatag	agt
aagttatgtg	gttggaggtaa	agttgtttttg	aga
ttaagggttag	gttgagaaat	taaggatgaa	att
tttggttagga	aaatgatttat	agacgggatt	agg
cggtaggggtc	gatagtgata	agatgtgttat	tgg
taagaatttag	taggggttagg	gagttatttta	ttt
gttggttattt	ttttttttttt	ttttttttttt	ttt
taggttggag	tgtagtgacg	taattttcgggt	tta

10

20

30

40


```

t a a t t t t t t t t g t t t t a g t t t t t t t a g t a g t t g g
g t t t a a t t t t t t t t t t t g t a t t t t a g t t g a g a t
t t t t g a a t t t t t t g a t t t t c g t g a t t t a t t t g t t t
g t t t g a g t t a t t a t g t t t a g t c g g t t g t t a t t t
t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t c g a t t
t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t
t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t t
t t t t t t t g a t a t a g a a t t t t t g t t t a t t a t t t a
t t a t t g t a g c g t c g a t t t t t t t t g g t t t a g g t g a
t g a g a t t a t a g g t g t a t g t t a t t a t a t t t a g t t
t c g t a g t a g a g a t g a g g t t t t t t t t a t g t t g t
a a g t a t t t t t t a t t t t a g t t t t t t a a t t g t t a g g a t t a t t a t a t g t t t g g g t t a t t a 15840
t a t t t a g t a t t t t t t t t t a a t a g a g a t g g g g t t
a t t t t t g a g t t t a a g t a a t t t t t t t t t t t c g g t
g c g t t a t t t t t a t t t c g t t a g g t t t t t a t t t t t a
t g t t g t g g t t t t g t t t t c g t t t t a t t a g g g t t t
t g t t t g t t t t t a t a t t a g g g t t t t g t g t t t a t t
t t t g a t t a t t a c g t t a t a t g g t t a g t t t t t t t t
g t t a t t t t t t t c g g g a a g g t t t t t t g a t t t t t t
g t t a t t t g t t a g t a t a t g a a g t t g g t t t a t t t t
g t t t t a t t t t g t c g t t t a g g t t g g t g t g t a g t g
a t t t t t t a g g t t t a a g t a a g t t t t t t a t t t t a g
t g t g t t a t t a t a t t t a g t t a a t t t t t a t t t t t
t t a g g t t g g t t t t a a a t t t t t g g g t t t a a g t a a
t g g g a t t a t a g g t g t g a a t t a t t a t a t t c g g t t
t t t g a g a a t t t g t a a t g a t t t a a t t t a t t g g g t
g g a a t g t a a g t t t c g t g a g a g t a g a g a t t a t g t
t a t t t t a a a t a g t a t t t g g t g t a t a a t a g a t g t
g t a g g g g a a a g g g a a g t g a a a g g a a a t a a a g a a

```

10

20

30

40

```

gtgcggagaa gttggttgga cgtgggaggg ttt
tgagggtgttg tgagttat ttt aggggggatatag gtt
agagggttgga agtagaaaatg taatggagag aat
ttaaagaggg ggtagaggag tatgagtgag tcg
aagttttatag ggatcggaaa taggcgtagg gta
cgtcggagtg agtatttaata aagtttttttt ttt
tcgatgggtgt tcggggattta tttaacgggat agt
ggcggaggggt cgtaggggggc ggggttgagt tag
ttaggtgagg aagaatcgtt tagtaattag tta
taatggtatt gtagggataa attttggtt aat
gggggttggtt cgagatcgtt tatagcgggtt agt
agtaggttcg ttigtgtt taggttcgtt tttttcggg agaggaggag ttatttggag 17580
ttttat ttttg ggttttaagtt gatagagcgg cgg
agtaatttttg gttgagggaag agtaatttaat ggg
agggttttaag gaaaaattttt aatagttttag ttt
ggttttat tta ttttagggcgt tgaggggattt att
ggggaggagtg ttttaggttag gtttaggtttt ggg
gggaggagtt gtttaggggg atgggggtttg gaa
tgggggttggt taggttcgta agagattgat att
ttgttttggaa tattaagggtt ttttttttttt tgg
aggaggcgggt tacgttggtta ttagtagtag gtt
gaaatagcgt ttttaggtttg tttagatagggt tgg
at ttgattaa gcgagtaaat ttaaggatat ttg
tttttaaggat tagcgtgttt aagataatttg gag
ttttttattgg ttgggtagtt gtttgtttaa tag
gttttg gatga tgataatttg tttatatattgg gta

```

10

20

30

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 7

caggccagtg gagtggcag

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 8

gaggagggtgc agctagtcctg

<210> 9

20

<211> 126

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 9

caggccagtg gaggtaggcagc cccagaactg gga
actgggagct gcatctgagg cttagtcctt gag
ctcctc

30

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

caaagcactg gctttggaac c

10

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

20

<400> 11

atcgagtgag tcctgctgga t

30

<210> 12

<211> 227

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 12

caaagcactg gctttggaac cggactgtct ggg
actgatggac tcaggcaatg ccttaaactc cctgagcctc aggttccttg tctgtaaaat 120

40

gataaagata gcccctgttt catagggctg tgg
aacgccatta tagcacagcg cccggcatcc agc

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

tgtctggagg ccacgggtcaa tga

20

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gtttgtattc ggttgtgtca tgctc

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

10

<400> 15

cccagttcat tgaaaccact

<210> 16

20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

30

<400> 16

ccttgctctt ctccttgtct

<210> 17

<211> 24

40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

10

gaacggttatt atagtatagc gttc

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequ
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

30

tcacgcatac gaaccctaac g

<210> 19

<211> 159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

40

<400> 19

gaacgccatt atagcacagc gcccggcatc cag
cgccatcatt gttatttagcg tggggccaggg agg
ggagagatgc cgtgggaccg tctgggttcg cat

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられるSHP1遺伝子ゲノムDNAのセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

50

【図 2】図 1 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 3】図 1・図 2 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 4】図 1～図 3 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 5】図 1～図 4 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 6】図 1～図 5 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

10

【図 7】図 1～図 6 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 8】図 1～図 7 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 9】図 1～図 8 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 10】図 1～図 9 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 11】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列を示す塩基配列図である。

20

【図 12】図 11 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 13】図 11・図 12 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 14】図 11～図 13 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 15】図 11～図 14 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 16】図 11～図 15 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

30

【図 17】図 11～図 16 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 18】図 11～図 17 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 19】図 11～図 18 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 20】図 11～図 19 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 21】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子の c D N A の塩基配列を示す塩基配列図である。

40

【図 22】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 蛋白質の概略構造を示す模式図である。

【図 23】図 22 に示す S H P 1 蛋白質のアミノ酸配列を示すアミノ酸配列図である。

【図 24】図 1 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A (センス鎖)において、C p G 島でメチル化される C G 配列の部位を示す塩基配列図である。

【図 25】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理にて、シトシンがウラシルに変換される過程を示す化学反応説明図である。

【図 26】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる重亜硫酸処理により、シトシンがウラシルへ変換され、メチル化されたシトシンが変換されない状態を示す模式図である。

50

【図 27】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子ゲノム D N A のセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 28】図 27 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 29】図 27・28 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 30】図 27～図 29 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 31】図 27～図 30 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

10

【図 32】図 27～図 31 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 33】図 27～図 32 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 34】図 27～図 33 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 35】図 27～図 34 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 36】図 27～図 35 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

20

【図 37】本発明にかかる造血器腫瘍細胞検出方法で用いられる S H P 1 遺伝子ゲノム D N A のアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 38】図 37 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 39】図 37・図 38 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 40】図 37～図 39 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 41】図 37～図 40 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖 30 に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 42】図 37～図 41 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 43】図 37～図 42 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 44】図 37～図 43 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 45】図 37～図 44 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 46】図 37～図 45 に示す S H P 1 遺伝子のゲノム D N A におけるアンチセンス鎖 40 に対して、重亜硫酸塩処理した後の塩基配列の続きを示す配列図である。

【図 47】(a)～(d)は、それぞれ本発明で用いられるメチル化特異的 P C R のステップを示す模式図である。

【図 48】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例 1 において用いられる P C R 用プライマーを示す塩基配列図であり、(c)は、(a)・(b)で用いられる P C R 用プライマーが認識する S H P 1 遺伝子(ゲノム D N A・センス鎖)の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 49】(a)・(b)は、本発明の実施の一例である実施例 2 において用いられる P C R 用プライマーを示す塩基配列図であり、(c)は、(a)・(b)で用いられる P C R 用プライマーが認識する S H P 1 遺伝子(ゲノム D N A・センス鎖)の塩基配列を示す 50

塩基配列図である。

【図 50】 (a) ・ (b) は、本発明の実施の一例である実施例 3 において用いられる R T - P C R 用プライマーを示す塩基配列図である。

【図 51】 (a) ・ (b) は、本発明の実施の一例である実施例 4 において用いられる r e a l t i m e R T - P C R 用プライマーを示す塩基配列図である。

【図 52】 (a) ・ (b) は、本発明の実施の一例である実施例 5 において用いられるメチル化特異的 P C R 用プライマーを示す塩基配列図であり、(c) は、(a) ・ (b) で用いられるメチル化特異的 P C R 用プライマーが認識する S H P 1 遺伝子 (ゲノム D N A ・ センス鎖) の塩基配列を示す塩基配列図である。

【図 53】 (a) は、蛍光 i n s i t u ハイブリダイゼーション (F I S H) を示す 10 図であり、(b) は、A L L 患者における S H P 1 遺伝子の異型接合性喪失の解析結果の 1つの典型的なデータを示す図である。

【 図 1 】

```

caatctagtgt gtgcccagtg tagcgaactt gtctctctcc aacacacacg ggcacagagb 60
ctgctgtgtgt cctgttttgg aacacagtggt cagcagtggt ggcagcagct tctgtgttag 120
actaacaccc cctcagtggt tctgtgtgac gtgtgtcttt aggcagagag tgcaccttcc 180
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 240
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 300
gacacacacg ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb 360
tctgtgtgtg ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb ggcacagagb 420
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 480
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 540
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 600
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 660
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 720
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 780
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 840
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 900
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 960
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1020
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1080
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1140
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1200
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1260
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1320
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1380
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1440
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1500
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1560
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1620
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1680
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1740
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1800
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 1860
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1920
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 1980

```

【 図 2 】

```

ctatgtgtgtgt gtatgtgtgtgt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc 2040
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2100
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2160
ctatgtgtgtgt gtatgtgtgtgt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc 2220
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2280
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2340
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 2400
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2460
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 2520
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 2580
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2640
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2700
tctgtgtgtg gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 2760
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2820
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2880
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 2940
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3000
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3060
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3120
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3180
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3240
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 3300
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3360
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3420
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3480
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3540
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3600
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 3660
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 3720
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3780
gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga ggcacagagb 3840
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 3900
cctcctcttt gacagtgctc ttatgttttg tctgtgtgtg agtctctagc agacacacga 3960

```

【圖 3】

tgatgtotta	tttctgttto	tasasttgg	tgastaaao	oatootaata	sgtttggoot	4020
ggagtattat	agfatattat	asagotgtto	agaoatgaa	ootgtogoot	taooagtotti	4080
taooatogst	attgttgaaa	tattgttaa	otoottttgo	agggggat	ttgtatgott	4140
asagatgto	ogaoatgto	ttcaattat	tttgtotgtt	ttgtototto	agootooot	4200
ttotatttgo	taooaoetta	tttgtatota	tttgtttttt	astttttttt	ttttttgaoo	4260
agatttcaa	tttgtttgao	aggttgat	gggttgat	ttgtatogot	ootgaooao	4320
taooaatot	gaogaaotgt	gtttaoaga	tttgtatga	aggttotooo	ttgtttgooo	4380
aggttgatto	gaootatgta	ootaaagta	ttototoooa	ttgtotooao	asagtgttgo	4440
atttaoatg	gttaatoot	gogooaat	atttttttt	ttttttaaa	aggttotooo	4500
tttgttgoao	agggootgt	asagtggao	asoottggt	castgtogoo	tgaoaoocoo	4560
aggttgaa	ogattotoo	ototagtat	ootaaatga	ttgttgoota	aggtttgt	4620
asooaatot	gotaaattt	gtatttttt	ttgttgaa	gttttotoag	ttgttotoag	4680
atttotooa	attttttgt	asattatoo	agoototao	ootaoogaa	ttgttgatt	4740
asaggttga	gootootga	otgttotta	ttotatttt	ttattotgt	ottotaaog	4800
asttttttt	tttttgtat	ttatogagt	ttattottgt	astttttgt	ootootog	4860
tttgttgo	ootaaagaa	atgttgaaa	ttttotao	ootaaogaa	ttgttoga	4920
ootaaagaa	ttgttttgt	gaaatggt	tgooaaog	asoottogo	aggttgaa	4980
aggtttgtt	tttttttgt	gootaaagt	agaaaggt	ttatottgt	tttgtttt	5040
tttgtttgo	tttgtatoo	ttatgaagt	ttotootgt	ttotattgt	aggttgatt	5100
gootttgt	tttttttgt	tttgootgt	astttotto	ootaaoggt	tttttaogoo	5160
ttgttgagt	tttttttgo	aggtttgaa	tgootttgt	ttgtttgaa	tgaoatgaa	5220
oottttgtt	ttgttogaat	tttttttgt	ggtttggt	ttgttogaat	ootgtttgt	5280
ttgtttgaa	ttgtttgaa	ttgtttgt	ttgtttgaa	ttgtttgaa	oottttgt	5340
otttttga	gootttgt	tttttgaa	ootaaoggt	ttattttgt	aggtttgt	5400
gootttggt	gaggtttt	tttttgaa	aggtttgt	ttgtttggt	ogootttgt	5460
ttgtatoot	ogootttgt	ogootttgt	oottttgt	oottttgt	gootttgt	5520
ttgtttgt	tttttttgt	ttgtttgt	aggtttgt	oottttgt	oottttgt	5580
aggtttgt	ogootttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	oottttgt	5640
aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	5700
aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	5760
aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	5820
aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	5880
aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	aggtttgt	5940

【圖 4】

agctgcgtgc	aacotcggct	tootggcttc	agctgcttct	ccgtgccttaa	ccotccagct	8000
agctggcctt	ccacggcgac	ccacccaatc	ccagctaat	tttttgctt	ttttgtagc	8060
agcagcttcc	ccacgttgcc	ccacgctat	ctgacgtctc	ctccctgctc	ctccgcgcgc	8120
cttgcctctc	ccacagtgct	gctttacccg	cttcgacccc	tgccgcctgc	ccctctcgc	8180
ttttatccac	ccactgcaca	ccagctccct	cttagaccgc	agacgtctcc	ctgtaccctc	8240
agactgtccc	agcaattgtt	ccacgttagc	ctattttatt	tttaacagct	agctgcctgc	8300
ccctctatca	ctctccacaa	ctgtctgac	gaacccctgt	tctcccccct	ccctgtctcc	8360
ccctccaccc	gittctccac	agcttagaga	ccacacatat	gtttttctta	gtttctccct	8420
cttgcctgac	ttttctctct	tttgtttgt	ccgtttctgt	gtttttctt	agctttacc	8480
gtggcgacgc	tcctatacct	tgctgttag	gcctctcgc	ctccacccgc	ccgtgacaa	8540
tcgcctcgtg	tgagcctctt	gtccccccgc	cccccggaga	tgaccctcct	ctgtgagtg	8600
cttgcctcgc	ccacagctgc	agctacacgc	cttagaccgc	ccactcttgc	ccacgtctgc	8660
tcagactgct	gtttctctct	ccctccctcc	agctgacgc	ccacccctgc	tttgttgtt	8720
agagcggcgc	ccactctctt	cttccacgc	tgccacgct	cttaacctt	agctctctct	8780
tcctccgtgc	gcctcttgcg	ccacggagcc	ttctaatctc	tgctttcttc	agcctctggc	8840
gcctgtgctt	agagcttcaa	agcactgct	tgccacccg	agctgttagc	ttgtactct	8900
agccctctgc	cgctactcct	gctgtcccca	gcactctct	taacctctct	agcctctct	8960
ttctctgtct	gtacaaattc	ccacgttagc	ctctctttct	agctgtctgt	tgagacccca	9020
ctccgcacag	gcctgtgacg	ccactttgc	ccacagcccc	gcctctccgc	agcctactcc	9080
ccgtgcctgc	tgctccccc	ctctattg	ttgcctgtc	ccacggcgac	ctgtcttcaa	9140
gcactgtctg	agctccgcgc	agctccgtgc	gcacccctgc	agctgtctgc	ctgtgcagct	9200
tcctgtgcgc	tgagctgtgc	agcccccaca	tgctctctta	ctgcactgtt	tgctctactc	9260
gcctacgtgc	ccctctctgc	ctctgttctg	ccacagctgt	agcagctgct	cccccctccc	9320
cccccctctc	ccacccctct	ctctcttctt	tcctcttctt	tcctctctta	ccagagctgc	9380
agctgacttc	cccccagctc	ctgcctgcgc	ctctctctct	ccctccctct	ccagctgcgc	9440
ccagcagctg	gactggcgag	cccgacagct	ggacgacccc	ggctgtgtag	ggccggccgc	9500
actccagact	ccactctccg	cttatccctc	gactctctct	ctctccccac	ctactgtccg	9560
ctctctctct	ctctctctcc	ctctctctct	ggacacccgc	agactgtgta	agctgtgctc	9620
tgcccccacc	agctgcagcc	agccagctgt	gcctgtctgc	ccagggccgc	ctctctctct	9680
ccctccctgc	gcacccgcgc	tgctttccac	gagacctccg	ctctgtccat	ccagacagcc	9740
tgctccagag	ccagctgtgc	ccagctgtag	ctctctctct	gccctactgc	aaagaccagc	9800
ctctactctc	ctctctctgc	actgacagc	gcacccccc	cccccgcgc	ttttgcaccc	9860
tcctctctct	ccctccctgc	ctctctctct	ctctctctct	tcctccctgc	agctgtctgc	9920

【图 5】

occcgttgtt	tcctcttgcc	ccacccccc	ccctcccat	ccctgttgtt	gcccccct	7980
gccccttgtt	gccccccc	agccctcc	ccgtctcc	ccctccctcc	ccctctctt	8000
ccacccctgt	cccccctcc	tcctccct	ccagctggcc	gacacacac	ccctatttgc	8140
gacacacac	tcacccggtt	tcctatgct	gtagccagcc	gacacattg	ccactctcac	8160
agacctgctg	gactatgaca	ctccacacac	ggctctcttc	gacaccccc	ccgcccacct	8280
gacacacac	agatccccc	tcacctgctg	ccatcccat	actccagct	gagccctcc	8280
cccccctcc	ctcccccag	agccctgac	ccgtccccc	ccctccccc	ccagcccgcc	8340
gagccctgac	gagccctcc	tgccctccct	ccctccccc	ccctccccc	ccacccgttc	8400
ccctccccc	ccctccccc	ctgctcttc	gagccctg	gctccccc	ctacccccc	8460
acccctccc	ccacccccc	agccctccc	agacccgc	ccctccccc	tcggccccc	8520
ctccctcc	cccccctg	cccccctg	cccccctg	ccctccct	ccagccctg	8580
tcggccctg	ccctctctt	gtagccctg	tcctctctt	ctccctcc	gcccctcc	8640
ctccctctt	ccctccccc	ccacccctg	agccctg	gagccctg	ctccctgac	8700
gagccctg	agctctcc	agccctctg	ctgctcttc	cccccctcc	ctccctgct	8760
gctctctt	gtagccctg	ctgctcttc	gccccccc	gagccctg	agccctgct	8820
gtagccctg	ccctctctg	agctcttc	ccgtcccc	gagccctg	actccctg	8880
gctctctt	ccctctctt	cccccctcc	tcctctctg	tccccccag	ctgagccctg	8940
gagccctg	tcctctctg	ccctccccc	ccctccccc	ctcccccag	ccctccccc	9000
tcgacccctg	ccctctctg	agccccccc	gacacccct	agccctctt	ccctccccc	9060
ccctccccc	gcccctctg	ccctccctg	gacccccc	tcctctctg	gctctctg	9120
ctgctctg	ccctccctg	tcgacccct	ccctctctg	gagccctg	ccctccccc	9180
gacacccct	ctctctctg	gacccctg	gacacccct	gctctctg	gtagccctg	9240
agccctctg	cccccctg	agccctctt	tcctctctg	ccctccccc	agccctccc	9300
tcctctctg	agccctccct	agctctcc	gtagccccc	ccctccccc	ccctccccc	9360
cccccctg	cccccctg	tcgacccct	gacccccc	agctctctg	ccctctctt	9420
ccctccccc	agccccccc	tcgacccct	agccctg	ctcccccag	gagccccag	9480
gagccccc	gagccccc	tcgacccct	agccctg	ctcccccag	gagccccc	9540
gagccccc	gagccccc	tcgacccct	agccctg	ctcccccag	gagccccc	9600
tcgacccct	tcgacccct	ccctccccc	agccctg	cccccctg	ctgagccct	9660
gtagccct	ctctccccc	agctctcc	gctctctg	ctctctctg	ccctccccc	9720
tcgacccct	tcgacccct	tcgacccct	gctctctg	tcctctctg	agccctccct	9780
tcgacccct	ccctccccc	ccctccccc	gagccccc	gagccccc	ccctccccc	9840
ccctccccc	tcctctctg	cccccctg	gctctctg	gagccccc	actccccc	9900

【图 6】

tttgggggto	tologgggtg	agttaoooto	ggagggggat	gagatggatt	ggagagagot	9980
ggttootooo	toottooooo	oatootggg	gttgaaagat	ttggagggoo	taoottogto	10020
oottgggtto	ggagaoooto	oatootgto	tootaoatto	ttoocagag	gagatttttg	10080
tttttttcat	oagctggatt	oatggggg	tgztttttt	ggagatoooo	tttoototg	10140
ggagggggat	gttattggg	gaaagggg	agttoottat	tttoogotga	oagooootto	10200
aantgggttt	gaaoototgg	ooatoottga	gtgaootgat	oagggggooo	oagaaagooo	10260
cttaacagot	ottttocag	tgatgtttg	ttocooagtt	oogotggga	ggagoooooo	10320
tcoogootto	tttgtagttg	agtgtatg	tootatbooo	oagoottogo	ttatgtttg	10380
otaggtotg	ttttttottt	gootgttgo	toigtgggg	oagootoooo	tootttgaag	10440
agattiooto	ttagttoott	tttooaagtt	tttttgata	ttggooottt	ttotgtttg	10500
oaggtggg	otttggttto	ggagooagat	tgagatattg	gagattggga	tggtttgaa	10560
oaggggttgo	ggagttggag	agagtttga	oogooogoot	gaaototogo	ottggagaaa	10620
gttgaggtga	aggttgooot	aggttggat	aggggttgo	gagattggag	ttacagotga	10680
ggtttgttt	ottotctatt	aagattggg	taattatata	oatgttoott	agotgtttg	10740
tgagagagot	aattgggttg	gttgattgg	agagattgag	oogagttggt	ggagooaggt	10800
aggtttgtta	ttttggoooo	ottattgtga	gtgtttotg	taagggoot	ooootgttgo	10860
tttggtttto	toottotogo	oagtttoott	toattttggt	agagttggca	agatttttgg	10920
gggagagagca	agagctttgct	ggagggagag	ggagagagoot	tttgggtttt	ttgtgtttgag	10980
agctttgagc	agctttgagca	ctttcttctt	ttttgtttca	gttagagagc	oagagctttg	11040
oagaggttgg	oogttcaggt	caagccagat	aaattcttgg	oagagaggg	gagagaggg	11100
oagggggg	gggtttggat	ggttoottg	tttgacaaa	gtattgggg	oagggggg	11160
ottgogttg	tttgatggg	gggtggggg	oaggggggg	aggggtttg	oattgttat	11220
gootatttg	goottoooo	gottggagc	ttacagagag	gttttttgg	agagctttgag	11280
agctttcag	agctttgag	oatttttga	agagagggga	tttagagag	gtcagagccc	11340
ttttgtttg	tttgagaggt	ggagttggg	oagagttg	toooaatto	oottgttat	11400
tootooagat	ttatgotttt	aggtttatg	agttttggg	tttttgtto	toooooagc	11460
agctttatg	ggagttggg	gttaatttgg	ottttatatt	ggagagagat	tttttaattga	11520
acagagagca	ttttgtttg	gattacagca	agagttttg	cttgagagat	ttttgtttg	11580
gtttggggg	ooggggggg	tgagggggt	gggtttggg	oagcttggtt	ggggggggg	11640
ggagagcttt	ooctotgttt	oagagotgt	otttttggg	aggggtttg	gagttttgg	11700
ttgttttgg	ttttttggg	gtttgtttg	tttoooooo	oagotttgg	agtttttgga	11760
agagagagat	gagagagatt	caagagcttt	ttggagggga	ggggggggg	agagagagca	11820
agagagagga	agagagatt	ttttttttt	agggggggg	ooggggggg	oagagaggt	11880

【图 7】

[illegible]

【图 8】

GTCCGCGCTG	BACAAATgta	gtgcgcgcgc	gcgcgcgcgc	ccctccgcgc	gtccctccct	13929
ggcctctgt	tcctctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	13930
ggcgcgcgc	ccctctctgt	tcgcctgtgt	gcgcgcgcgc	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14040
ATGACGATG	GTCCGCGCGC	CATGCGCGCG	CGAGTACGCG	TGCGCGCGCG	GTGCGCGCGC	14100
TGCGACGAT	CACCGCGCGC	CGAGCGCGCG	TGCGCGCGCG	GTGCGCGCGC	ATGCGCGCGC	14160
GCAGTgta	gtgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14220
tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14280
ccgcgcgcgc	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14340
ccgcgcgcgc	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14400
ccgcgcgcgc	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14460
ccgcgcgcgc	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14520
ccgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14580
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14640
ccgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14700
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14760
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14820
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14880
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	14940
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15000
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15060
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15120
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15180
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15240
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15300
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15360
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15420
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15480
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15540
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15600
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15660
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15720
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15780
tcgcctctgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	tcgcctgtgt	15840

【図 9】

[illegible]

【图 10】

atgaaaggt	gagotaga	ttagaaga	ggtgtgta	cccaagagaa	caacatcatt	17885
aaactagct	ttagctggt	gcaacatga	tgagagcgt	gatacacta	ccatgatct	17940
gattgaca	tgtatgaa	gagacatga	tgacagcga	gagacagca	ctgtgacg	18000
ccacagctg	tcctctctg	agggaaaga	gacatctga	ttagagaga	ctgtacagc	18060
gacatctaa	actatcaga	ggcgtctgt	ctctctcat	cttagagaa	atttagaaa	18120
ctgtctgag	tacagatga	ttgtttttt	gtccctctt	acttccaaa	tgtagagat	18180
gaaattctt	ctttattga	aaacatgta	tcttgagaa	tacaaagct	ggagatctg	18240
actcagaga	tctgtggaa	actcctctg	agctgagaa	gaagcagca	ccaaagcga	18300
agagctgtg	ctgtatcag	tacaaagta	cttagagaa	ccacagctg	aaagcttga	18360
aaacttcaa	gaactctg	aaactagaa	actatctga	gaa		18404

【圖 11】

ttotocotcag	ocgocotocot	agttocagga	agttocagga	otctagatc	otctagacac	60
agctgctctc	taagctatct	atagatctc	cagococotc	otctagctt	tgagacotg	120
ctctgctctc	ottctotcga	atagctcag	agacotctc	gagctagct	ttocacocot	180
ttttctctcc	agacacocot	ttttctcag	agacacacac	ococotctc	gactctgac	240
agagagctc	agagacacac	acagacotc	ttctcctag	cagctcttc	acactcttc	300
cagagctc	agagacac	ocgctctc	gagctagct	gctctgctc	occgctctc	360
ctctagctc	ttctctctc	cocgacac	gagctagct	agctctc	ttactctc	420
ttctcctc	ttttctctc	ottctctc	cagctagct	cagctctc	agagctctc	480
atctagctc	cocctctc	ttctcctc	ttctcctc	gctctgctc	ttctgctc	540
agctctc	agctctctc	agctctctc	otctcctc	cagctctc	gtctctctc	600
gagctctc	agctctctc	gtttctctc	occtcctc	ocgctctc	acactctc	660
ttctagctc	gctctctc	agctctctc	ttctctctc	ttctctctc	gactctctc	720
agctctctc	agctctctc	cocctctc	ttctcctc	ttctcctc	gtttctctc	780
acacacotc	ttctctctc	otctctctc	gctctctc	gtctctctc	ttacocotc	840
ttococotc	agctctctc	ggctctctc	acococotc	ctctgctc	agggctctc	900
ttctcctc	gagctctc	agacacac	agttacotc	otctcctc	otctctctc	960
ocacacotc	gagctctc	agctctctc	gagctctc	agttacotc	ggctctctc	1020
-TACAAAGAG	GAAGGCTG	GGCTGGTG	GGCTGGTG	GGCTATAT	AGAGTGAAG	1080
AGAGTGAAG	GGATGACG	GATTAAAT	ACAAAGAT	GGGACGCT	TAGGTGAG	1140
TTGTAGCT	GTCTAGCG	AAATGCTC	ACAGGTCG	GGTGAAGT	gagacagct	1200
TTGTAGCT	gtctagctc	gtctagctc	gtctagctc	gtctagctc	gtctagctc	1260
gtctagctc	agctagctc	gtctagctc	ococotc	agctagctc	agctagctc	1320
agctagctc	agctagctc	gagctagctc	cagctagctc	agctagctc	gtctagctc	1380
AGACAGAG	GGTCTCTC	GTCTTAGG	ACCTGTBT	CTTGTCTG	TTGTGTAC	1440
GTCTGTCT	GGCTTTCT	TCCTTTCT	TTGTAGCT	AGCTTTCT	TACAGTCT	1500
CTCTGTCT	gagctagctc	agctagctc	agctagctc	cagctagctc	agctagctc	1560
cagctagctc	agctagctc	ctctagctc	otctagctc	occtagctc	agctagctc	1620
agctagctc	otctagctc	otctagctc	otctagctc	agctagctc	ttctagctc	1680
gactagctc	otctagctc	gagctagctc	occtagctc	gactagctc	agctagctc	1740
agctagctc	gagctagctc	agctagctc	gtctagctc	ttctagctc	ttctagctc	1800
gtctagctc	gagctagctc	gtctagctc	gagctagctc	agctagctc	occtagctc	1860
gagctagctc	occtagctc	GTAGAGAG	GGAGAGAG	TTGATCTG	ATTGATCTG	1920
CTGTGGAG	AGGATGTT	CGGATGTC	GACTGTGG	CTTGTCTG	atctagctc	1980

【图 12】

[illegible]

【例 13】

[illegible]

【圖 14】

tgagccagca	cagcctctga	acacatcgcc	ccctccccc	tgagagagc	agagctggc	6000
tttgcccagc	tgctctctga	tctaggttgc	cccccacccc	caggagcttc	acaggccgca	6100
ctctctctcc	ccagctagcc	ccacatctg	ccctttgatg	agtttgacat	gatgatattg	6200
gaccccgagg	tggttatctg	ccctccctgg	agagatctgc	tgactctatc	agagctagat	6300
gagccagagc	cgagcgagat	gtgttgatg	agcagagag	cccccacccc	tgctgacccc	6400
ccctctctgg	taagccagcc	ttctgtctgc	agagagctat	agcctgttgc	gagacgttgc	6500
gagcagcgag	tgagagctgc	tctgtatg	gagagctgc	tgactccac	gagctgttgc	6600
agcagcgagc	acacatctgc	ctgtctctgc	gagagcttc	ctagagagag	tgagcgctgc	6700
ttgagagag	gagagctgtc	gtctctctgc	tgagagagc	ccctctctgc	gagtagagc	6800
tgagacctgc	tgctctctgc	gagagctgc	gagagagag	cgatctctgc	agctagagc	6900
gagagctgc	tgctctctgc	gagagagag	gtctctctgc	ttctctctgc	ttctctctgc	7000
ctgtctctgc	tgagagagc	gtctctctgc	ctgtctctgc	tgctctctgc	agctctctgc	7100
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7200
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7300
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7400
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7500
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7600
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7700
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7800
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	7900
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8000
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8100
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8200
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8300
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8400
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8500
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8600
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8700
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8800
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	8900
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9000
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9100
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9200
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9300
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9400
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9500
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9600
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9700
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9800
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	9900
gagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	tgagagagc	gagagagc	10000

【 図 1 9 】

tmoocagtat ttttttttt taguattggt gtototatat gtigocaggt atgttttaa 15900
 atootageto taguaguoat ttoooooto gnotococaa atgtotgga toaagagot 15960
 gogooooto atutotgto gtittatott toacatoot agtoococaa tigtotaaao 16020
 tigtotgga atgtotgto toacatgga toototgga oggococot gtotitttt 16080
 ttttttttt caoattaggt atgtttgto acatootot atgococaggt atgtotgnt 16140
 atgtotgnt agtoocaggt gogoototot atgtototot atoggggtot agtoocant 16200
 gtocotoot oggagagoo toootgtat toocagotag taatgtocoo tgcococoo 16260
 gtocotgnt agtatgaa atgtatgat ttttttttt ttttttttt ttgococag 16320
 gtocototot gtococaggt atgtatgaa gtgtatgat atgtotgaa tgcococgt 16380
 acotocaggt atgtocaggt atgtototot atgtototot atgtotgaa acocagaggt 16440
 tigtococoo acococaggt atgtototot ttttttttt atgtototot atgtotggt 16500
 acaggtotgt atgtocotot tggototag atgtototot atgtototot acocaggt 16560
 tggototaa atgtototot atgtococaggt atgtototot atgtototot 16620
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16680
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16740
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16800
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16860
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16920
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 16980
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17040
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17100
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17160
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17220
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17280
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17340
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17400
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17460
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17520
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17580
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17640
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17700
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17760
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17820

【 図 2 0 】

atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17880
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 17940
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18000
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18060
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18120
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18180
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18240
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18300
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18360
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 18404

【 図 2 1 】

atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 60
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 120
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 180
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 240
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 300
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 360
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 420
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 480
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 540
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 600
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 660
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 720
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 780
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 840
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 900
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 960
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1020
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1080
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1140
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1200
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1260
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1320
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1380
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1440
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1500
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1560
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1620
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1680
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1740
 atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot atgtototot 1794

【 図 2 3 】

MVRWFHRLDLSGLDAETLLKGRGVHGSFLARPBRKNQGDLSVRVGDQVTHIRIQNSG
 DFYDLYGGEKFAITLVEYYTQQQGLQDRDGTIHLKYPLNCSPTSERWYHGHMSG
 GQAEITLLQAKGEFWFLVRESLSQPGDFVLSVSDQPKAGQSPFLRVTHIKVMCEGGRY
 TVGGLETDFSLDLVEHFQKTGIEEASGAFVYLRQPYATRVNAADENRVLELNKKQDESE
 DTAKAQWEEFESLQKQEVKNLHQRLEGQRPNKGNRYNKLFFDHSRVLQGRDSNI
 PGSDYINAYIKQLLGPDENAKTYIASQGLEATVDFWQMAWQENSRVIMTTREVE
 KGRNKCVPYWEVGMQRAYGPYSVTNCEGHDTTEYKRLTLQVSPLDNGDLIREWHYQ
 YLSWPDHGVPEPGGVLSFLDQINQRQESLPHAGPIVHCBSAGIRGTIIVDMLENIST
 KGLDCCDIDQKTIQMVRAQRSGMVQTEAQYFYVIAQFIETTKKKLEVLQSQKQDESEY
 GNITYPAMKQAHAKASRTSSKHEDVYENLHTKNKREKVKKQRSADKESKSGSLURK

【 図 2 2 】

N				C			
SH2	SH2		PITPase Domain				C-terminal

【圖 30】

4020
4060
4140
4200
4260
4320
4380
4440
4500
4560
4620
4680
4740
4800
4880
4920
4980
5040
5100
5160
5220
5280
5340
5400
5480
5520
5580
5640
5700
5760
5820
5880
5940

[illegible]

6000
6060
6120
6180
6240
6300
6360
6420
6480
6540
6600
6660
6720
6780
6840
6900
6960
7020
7080
7140
7200
7260
7320
7380
7440
7500
7560
7620
7680
7740
7800
7860
7920

【圖 3 2】

7980
8040
8100
8160
8220
8280
8340
8400
8460
8520
8580
8640
8700
8760
8820
8880
8940
9000
9060
9120
9180
9240
9300
9360
9420
9480
9540
9600
9660
9720
9780
9840
9900

[illegible]

1002
1008
1014
1020
1026
1032
1038
1044
1050
1056
1062
1068
1074
1080
1086
1092
1098
1104
1110
1116
1122
1128
1134
1140
1146
1152
1158
1164
1170
1176
1182
1188

【图 3 4】

TTTTGGTGG	GATAATG	gtgtgtttt	ggttttttt	tattttggg	ggttttttt	13620
ggttttttt	ttttttttt	gtgtgtgtg	tgtgttgtt	gagtgtttt	gggtttggg	13680
ggagtttga	tttttgttt	tggttttga	GAGATTGAT	TGGGAGATT	TGGTATTAT	14040
AGTATTGAG	TTGTTGGAT	TATGGGTTT	TTAGTGGTT	TGGGGGTGT	TTTATGTTT	14100
TGATTATGT	TAAATGAGG	TAGGAAAGT	TGTTTAACT	AGGTTTATT	ATGTGTTAT	14160
TGATGTAG	atgattttt	gtgtgttgt	ggttttttt	ggagtatga	ttgttttgg	14220
tgttgttgt	tgtttatgt	astatagaa	tttgttoga	tatttgagt	tttttgtta	14280
tttttgttt	tttttgttt	tttttgttt	tttgttttt	tttgttgat	gttttgtga	14340
tgttgtttt	tgttgtttt	gttgttttt	tattttttt	agatttttt	tgttgttgt	14400
tttttgttt	atttttttt	astataggg	gggtttggg	gatttttgt	tgttgttgt	14460
ttagtgtgt	ttagtgttg	tggttgtgt	tttttgtta	gttttgttt	tgttgttgt	14520
ggttttttt	ggagttttt	tttttgttt	ttttttttt	agagttttt	atgttgttt	14580
ttttttttt	ttttttttt	tttttttgg	tgttgttgt	gttgttgtt	tttttgttt	14640
tgttttttt	tttttgttt	tttttgttt	gtttttttt	ggttttttg	gttgttgtg	14700
gtgttgtgt	gtttttttg	gttgttgtat	atttttttt	ttttttttt	ogatttgtt	14760
tgttgttgt	gttttttgt	gttgttgtg	gttgttgtt	ttagtgttgt	ttagtgttt	14820
atagatgtt	tttttgttt	gttgttgtt	gggttgttt	gagtgttgt	gttgttgtt	14880
tttttgttt	ttagtgttt	gttgttgtt	aatattttt	atttttttt	tttttgttt	14940
tttttgttt	aatatttga	tttttgttt	gttgttgtg	tttagtgtg	tttttgttt	15000
gttgttgtt	tttttgttt	tttttaaat	tttgttgtt	tttttgttt	gttttgttt	15060
tgttgttgt	aatatttgtg	tttgttgtt	gttgttgtt	gtttttttt	atttttttt	15120
tgttgttgt	gttttgttg	gttttgttt	gtttttttt	tttttgttg	tgttgttgt	15180
tttgttgtt	tttgttgtt	gttttgttg	gttttgttg	tttgttgtt	gttgttgtt	15240
gttttgttt	ttttttttt	ggatgttgtt	tatttttgt	gttttgttt	tttgttgtt	15300
tgttgttgtt	tttttgttt	tttttgttt	tttttgttt	tttttgttt	ogtttgttt	15360
aggttgtgt	gttgttgttg	tttttgttt	tttttgttt	tttgttgtt	atgttgtgt	15420
ttagtgttt	gttttgttt	gttttgttt	ggatgttgtt	ggatgttgtt	tgttgttgtt	15480
tttttgttg	tttgttgttg	agagatgtt	tttttgttt	gttttgttt	gttttgttt	15540
ttttgttgt	tgttgtttt	tgttgttgt	gttttgttt	tttgttgtt	aggttgttg	15600
ggatgttgt	aggttgttt	tttgttgttg	ogtttgttt	tttttgttt	agaggttgtt	15660
gagtttgtt	aggttgttt	atgttgttg	atgttgttg	gttttgttt	tttttgttt	15720
tttgttgttg	gttgttgtt	tttgttgtg	tgttgttgt	ggatgttgt	tttgttgtt	15780
oggttgttg	gttgttgtt	aggttgttt	atgttgttg	atgttgttg	ggatgttgt	15840

【图 3 6】

agggantagt	gaggttagaa	ttoganttta	gattgttga	ttttagagt	talatttttt	17880
attttgagt	tgtagttag	gittatttta	ggagggtttt	guttatattt	ttttgagt	17840
gatttttag	tttganttaa	gagagtagt	taagttagg	agagtagat	ttgaggttag	18000
ttaggttag	ttttttttg	agggantag	gatagtttt	ttaggtatt	aggttaggt	18060
tagtttttt	ttttatttag	ttgttgttg	tttttttt	tttgtaga	gtttagag	18120
ttaggttag	tgagagtag	ttgtttttt	gtttttttt	tttttttta	tttttaggt	18180
gggttttt	ttttattta	aatattgtg	tttgaggag	taagttagt	ggaggtatt	18240
tttgaggag	ttgttaggt	tttttttga	aggttaga	tagtataggt	tttaggttt	18300
aggttttag	agttattat	ttagtattt	tttagagt	tttaggtgt	ataggtatt	18360
atgttttt	gattttttg	atttttagg	gttttagg	gaga		18404

【圖 4 5】

[illegible]

【圖 46】

ssgsgsgsgt	tttgatgsgt	sttgsgtttt	sgsgsgsgt	tgsgtttgt	tggsgttttt	17880
sssgsgsgtt	sttgsgsgsg	sgsgsgtttt	sgsgsgsgsg	sgsgsgsgsg	sgsgsgsgsg	17940
tgsgsgttgt	tgsgsgtgt	agsgsgttgt	sttgsgtgt	agsgtgtgt	gtgttgtttt	18000
tttgsgsgsg	tgsgsgtgt	tttttttttt	tgsgsgtgt	stsgsgsgsg	gtsgtttttt	18060
sgsgsgsgsg	tttgsgtgt	tttgsgtgt	gtttgtgtgt	gtsgsgsggt	stsgsgsggt	18120
sgsgsgsggt	tttttttttt	tttgsgtgt	tgsgsgtttt	agsgtgtgt	gttgsgtgt	18180
sttgsgtgt	sgsgsgsggt	stsgsgtgt	tttgsgsgsg	tgsgsgsgsg	ttgttttttt	18240
tttgsgsggt	tgsgsgtgt	tgsgsgtgt	sgsgsgsgsg	tgsgsgtgt	stsgsgtgt	18300
ttttgtgt	tgsgsgtgt	gtttgttgt	tgsgsgtgt	gtsgsgtgt	sttgsgtgt	18360
sttgsgtgt	gtsgsgtgt	ttttgttgt	sgsgsgtgt	stsgsgtgt	stsg	18404

【図 47】

(a)

Wild type DNA

5' - AGCTCGCGATGCCAGCTCGTCC - 3' sense strand
3' - TCAGCGCTACGATCGACCGAGC - 5' antisense strand

(b)

Disubstituted

5' - AGTTCCGCGATGTTAGTTCGTTCC - 3' sense strand
3' - TTGAGCGCTATCGTTGAGCGAGC - 5' antisense strand

(c)

FW primer

5' - AGTTCCGCGA
5' - AGTTCCGCGATGTTAGTTCGTTCC - 3' sense strand
3' - TCAAGCAAGC - 5' RV primer

(d)

FW primer

5' - AACTCCCGA
3' - TTGAGCGCTATCGTTGAGCGAGC - 5' antisense strand
3' - TTGAGCGAGC - 5' RV primer

【圖 48】

(a)

REP-S1 : 5' -CAGCCAGTGGAGTGGCAG-3'

(b)

REP-AS1 : 5' -GAGGAGGTGCAGCTAGTCTG-3'

(c)

(#7441)

CAGGCCAGTGGAGTGGCAGCCCCAGAACTGGGACCACTGGGGTGGTGA

REP-S1 HpaII

GGCGGCCCGCACTGGGAGCTGCATCTGAGGCTTAGTCCCTGAGCTCTCT

HpaII

GGCTGCCCAGACTAGCTGCACCTCCTC (#7565)

REP-AS1

[4 9]

(a)

REP-S2 : 5'-GAAAGCACTGGCTTTGGAAC-3'

(b)

REP-AS2 : 5'-ATCGAGTGAGTCCTGCTGGAT-3'

(c)

(#8858)

CAAAGCACTGGCTTTGGAACCGGACTGTCTGGTTTGAATCCTGGCACTG

REP-S2 Hpa II

CAGCTGACTCACTGATGGACTCAGGCAATGCCCTAAACTCCCTGAGCCTG

AGTTTCCTTGTCTGTAAATGATAAGATAGCCCTGTTTCATAGGGCTGT

GGTGAGAAACCAATCAGACAGGCATGTGAACGCCATTATAGCAGCG

CCCGGCATCCAGCAGGACTCACTGGAT (#7084)

Hpa II REP-AS2

[5 0]

(a)

SHP1-PF1: 5'-TGTCTGGAGGCCACGGTCAATGA-3'

(b)

SHP1-PR1: 5'-GTTTGTATTGGTTGTGTCATGCTC-3'

[5 1]

(a)

SHP-LF1: 5'-CCGAGTTCATTGAAACCACT-3'

(b)

SHP-LR1: 5'-CCTTGTCTTGTCTCTTGTGT-3'

[5 2]

(a)

MF2 : 5'-GAACGTTATTATAGTATAGCGTTC-3'

(b)

MR2 : 5'-TCAGGCATACGAACCCAAACG-3'

(c)

(#7037)

GAACGCCATTATAGCAGCGCCCGGCATCCAGCAGGACTCACTGGAT

MF2

GACAGTTGTACCGCCATCATTGTTATTAGCGTGCGCCAGGAGGCGT

GCCTAAAGCAGCTGCTGGAGGAGGAGAGATGCCGTGGACCGTCTGGGTTCCGATCGGTGA (#7105)

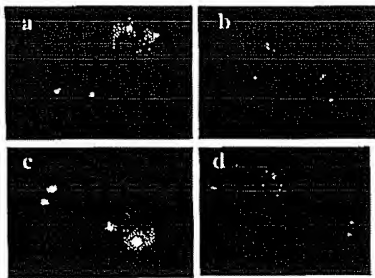
MR2

[5 3]

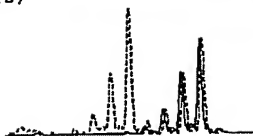
(a)

FISH analysis of ILTMot and NK-YS cells with chromosome 12 or SHP1-specific probes

cells	probe	positive signal No.(%)					
		0	1	2	3	4	more
ILTMot	Ch #12	1	1	97	1	0	0
	SHP1	1	2	95	1	1	0
NK-YS	Ch #12	0	0	99	1	0	0
	SHP1	1	3	91	4	1	0



(b)



Microsatellite marker	LOH
D12S356	15/19 (79 %)
D12S336	6/16 (38 %)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
G 0 1 N 27/447	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	A
	G 0 1 N 27/26	3 0 1 A
	G 0 1 N 27/26	3 1 5 J
F ターム (参考)	4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ33 QQ43 QQ53 QQ62 QR08 QR14 QR32	
	QR50 QR62 QS11 QS16 QS25 QS34	